

Université de Sherbrooke

**Impact d'une délétion conditionnelle du récepteur BMP_{1a} au niveau de
l'épithélium intestinal chez la souris**

Par

Yannick Benoit

Département d'anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en biologie cellulaire

Septembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17271-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17271-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	VII
ABRÉVIATIONS.....	X
RÉSUMÉ.....	XII
I – INTRODUCTION.....	1
1. La muqueuse intestinale.....	1
1.1 L’axe crypte-villosité.....	2
1.2 L’épithélium de l’intestin grêle.....	3
2. La voie de signalisation BMP.....	8
2.1 Les facteurs BMPs.....	9
2.2 Les rôles de la voie BMP.....	10
2.3 Signalisation via la voie BMP.....	12
2.4 Régulation de la voie BMP.....	18
3. Utilisation de la souris comme modèle expérimental.....	21
4. Le système Cre/LoxP.....	23
5. Projet de recherche et hypothèse.....	25

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
1. Les lignées de souris utilisées et les différents croisements.....	30
2. Géotypage des souris par réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	32
3. Injection, euthanasie et dissection des souris.....	34
4. Fixation des tissus et inclusion dans la paraffine.....	35
5. Dissociation et recouvrement des cellules épithéliales intestinales.....	36
6. Extraction d'ARN.....	37
7. Extraction protéique.....	38
8. RT-PCR.....	39
8.1 Réaction de transcription inverse (RT).....	39
8.2 PCR : conditions et amorces utilisées.....	40
9. Technique de détection de la β -galactosidase.....	41
10. Immunofluorescence indirecte.....	42
11. Coloration hématoxyline et éosine (H & E).....	46
12. Immunobuvardage.....	47
13. Analyse par PCR quantitatif.....	50
14. Hybridation <i>in situ</i>	53
15. Mise en évidence des mucines sulfatées par coloration au bleu d'Alcian.....	56
16. Microscopie électronique à transmission.....	57
17. Analyse des résultats et statistiques.....	58

III – RÉSULTATS.....	61
1. Détermination du génotype des souris.....	61
2. La recombinaise Cre dans notre modèle expérimental.....	64
2.1 Expression de la recombinaise Cre au niveau du tube digestif.....	65
2.2 Expression de la recombinaise Cre au niveau de l'axe crypte-villosité....	68
3. Expression des facteurs et récepteurs BMP au niveau de l'épithélium intestinal.....	68
4. Immunolocalisation du récepteur BMPRIa.....	72
5. Vérification de l'efficacité de la délétion sur la transduction du signal.....	75
6. Impact de la délétion de <i>BMPRIa</i> au niveau de la morphologie de la muqueuse intestinale.....	78
7. Impact de la délétion de <i>BMPRIa</i> sur la prolifération cellulaire.....	79
8. Analyse de l'expression de divers gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine....	85
8.1 Niveaux d'expression du facteur c-Myc.....	85
8.2 Niveaux d'expression de la cycline D2.....	86
8.3 Niveaux d'expression de la matrilysine/MMP-7.....	87
9. Impact de la délétion de <i>BMPRIa</i> sur la migration cellulaire.....	90
10. Implication de la E-cadhérine dans la modulation de la migration cellulaire..	91
11. Impact de la délétion de <i>BMPRIa</i> au niveau de la différenciation cellulaire...	92
11.1 Les enzymes de la bordure en brosse et les marqueurs de maturation....	95

11.2 Les cellules de la lignée sécrétrice.....	101
11.3 La différenciation des cellules entéroendocrines.....	111
11.4 La maturation des cellules caliciformes.....	112
IV – DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.....	116
1. Morphologie et prolifération cellulaire.....	116
2. Influence de la voie BMP sur la voie Wnt/ β -caténine.....	120
3. La voie BMP et la migration cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal..	123
4. La voie BMP et la différenciation cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal.....	126
5. Implication de la voie BMP dans la voie du devenir cellulaire.....	128
6. Perspectives.....	130
V - REMERCIEMENTS.....	132
VI - BIBLIOGRAPHIE.....	134

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

1. L'axe crypte-villosité.....	6
2. Mécanisme d'activation des récepteurs BMP et la voie des Smads.....	15
3. Insertion des séquences LoxP au niveau du gène <i>BMPRIa</i>	29
4. Détermination du génotype des différentes lignées de souris.....	63
5. Visualisation de l'efficacité de recombinaison chez les souris villine-Cre; <i>Gtrosa26^{tm1Sor}</i>	67
6. Patron d'expression du messager de facteurs et de récepteurs BMP au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris.....	71
7. Immunolocalisation du récepteur BMPRIa.....	74
8. Effet de la délétion de <i>BMPRIa</i> sur la voie Smad.....	77
9. Impacts morphologiques de la délétion de <i>BMPRIa</i>	81
10. Impact de la délétion de <i>BMPRIa</i> sur la prolifération et la migration cellulaire.....	84
11. Modulation de l'expression de certaines cibles de la voie Wnt/ β -caténine.....	89
12. Localisation et expression de la E-cadhérine au niveau de l'axe crypte-villosité chez des souris villine-Cre; <i>BMPRIa^{LoxP/LoxP}</i> et des souris contrôles.....	94

13. Localisation et niveaux d'expression du messager de la SI au niveau de la muqueuse intestinale de souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et contrôles.....	98
14. Immunolocalisation de la phosphatase alcaline au niveau de la muqueuse intestinale de souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et contrôles.....	100
15. Localisation et expression de marqueurs de maturation des entérocytes chez des souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et des souris contrôles.....	103
16. Les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal chez les souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et les souris contrôles.....	106
17. Mise en évidence des cellules de Paneth chez les souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et les souris contrôles.....	108
18. Mise en évidence des cellules entéroendocrines chez les souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et les souris contrôles.....	110
19. Localisation et quantification du facteur Klf-4 au niveau de l'épithélium intestinal des souris villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP} et des souris contrôles.....	115

Tableaux

1. Lignées de souris utilisées.....	31
2. Croisements entre les lignées de souris.....	32
3. Informations relatives au génotypage par PCR.....	34
4. Préparation des tissus en vue de l'inclusion dans la paraffine.....	36

5. Liste des amorces et des conditions utilisées en RT-PCR.....	41
6. Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.....	45
7. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence.....	46
8. Liste des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage.....	49
9. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunobuvardage.....	50
10. Amorces et gènes de références utilisés en PCR quantitatif.....	53

ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMH : Anti-mullerian hormone

APOBEC : ApoB mRNA editing complex

ARN : Acide ribonucléique

BAMBI : BMP and activin membrane-bound Inhibitor

BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

bHLH : Basic helix-loop-helix

BMP : Bone morphogenetic proteins

BMPR1a : Bone morphogenetic protein receptor type 1a

BrdU : Bromodéoxyuridine

BRE : BMP response element

BSA : Bovine serum albumin

DAPI : 4,6-Diamidino-2-phénylindole

DEPC : Diéthyl pyrocarbonate

dNTP : Déoxynucléotides triphosphates

ECL : Enhanced chemiluminescence

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : Ethylenebis (Oxaloethylenitrilo) tetraacetic acid

FITC : Fluorescein isothiocyanate

IFABP : Intestinal fatty acid binding protein

JPS : Juvenile polyposis syndrome

KDa : Kilodalton

Klf-4 : Kruppel-like factor 4

MAD : Mothers against decapentaplegic

MES : 2-(4-morpholino)-ethane sulfonic acid

MH1 et 2 : MAD homology 1 & 2

MMP : Matrix metalloproteinase

NBT : Nitro blue tetrazolium chloride

NP-40 : Nonidet® P-40

pb : Paires de bases

PBS : Phosphate buffered saline

PBT : PBS-BSA-Triton

PCR : Polymerase chain reaction

PFA : Paraformaldéhyde

PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

PVDF : Polyvinylidene difluoride

RT : Réverse transcriptase

SBE : Smad binding element

shRNA : Small hairpin ribonucleic acid

SI : Sucrase-isomaltase

SSC : Saline-sodium citrate buffer

TBP : Tata binding protein

TEA : Triéthanolamine

TGFβ : Transforming growth factor β

RÉSUMÉ

Impact d'une délétion conditionnelle du récepteur BMPR1a au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris

Yannick Benoit

Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke

Les facteurs BMP (Bone Morphogenetic Protein) sont des protéines multifonctionnelles associées à la superfamille du TGF β qui interagissent avec des récepteurs de surface cellulaire à activité sérine/thréonine kinase. L'association entre les facteurs BMP et leurs récepteurs entraîne une cascade de signalisation intracellulaire via la voie des SMADs. La voie de signalisation BMP est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire ainsi que dans la tumorigénèse. Malgré le potentiel intéressant des facteurs BMP dans la régulation des mécanismes cellulaires de l'épithélium intestinal, les connaissances sur les éléments clés de la cascade de signalisation par la voie BMP sont peu développées. La principale problématique entourant l'étude de la voie BMP dans un contexte *in vivo* découle du fait que l'invalidation de cette voie de signalisation, selon les méthodes classiques de délétion, provoque la mort précoce de l'embryon due à une absence de formation de structures essentielles au développement de celui-ci. Nous avons donc procédé à la délétion conditionnelle du récepteur BMPR1a, via l'utilisation du système Cre/LoxP, afin d'obtenir une invalidation de la voie BMP exclusivement au niveau de l'épithélium intestinal. C'est par l'utilisation d'un promoteur tissu spécifique que nous avons pu

diriger l'expression de la recombinaise Cre afin d'induire la délétion de *BMPRIa* uniquement au niveau de l'épithélium intestinal. Nous avons donc mené des études sur la voie de signalisation BMP en procédant à la rupture de celle-ci au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris. Cette méthode nous a permis d'identifier différents gènes cibles affectés par cette voie de signalisation à l'intérieur de certains processus cellulaires. Les expériences menées sur nos souris mutantes nous ont permis de démontrer que la voie BMP semble jouer un rôle restrictif sur le phénomène de prolifération cellulaire notamment par son influence sur la voie Wnt/ β -caténine. De plus, la voie BMP semble être impliquée dans la spécification de certains types cellulaires de l'épithélium intestinal, plus particulièrement au niveau de la différenciation des cellules entéroendocrines et de la maturation terminale des cellules caliciformes. L'invalidation de la signalisation par la voie BMP nous a aussi permis d'observer une augmentation de la vitesse de migration des entérocytes à l'intérieur de l'axe crypte-villosité chez nos souris mutantes. Cela nous laisse croire que cette voie de signalisation est impliquée, entre autre, dans l'établissement des complexes de jonctions adhérentes et/ou dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. En conclusion, les différents résultats recueillis au cours de mes travaux dans le laboratoire du Dr Perreault nous suggèrent une implication de la voie BMP au niveau de la prolifération, de la migration et de la différenciation cellulaire ainsi qu'au niveau du maintien de l'intégrité tissulaire de l'épithélium intestinal.

Mots clés : BMP, Cre/LoxP, Épithélium intestinal, Souris, Délétion.

I – Introduction

1. La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale, est composée de trois sous-couches, soit un épithélium, une lamina propria et une muscularis mucosae. En plus de ces principales fonctions telles que l'absorption de nutriments vers la circulation sanguine, la sécrétion d'enzymes digestives, d'hormones et de mucus ainsi que la protection contre les maladies infectieuses (MARIEB, 1998), la muqueuse intestinale constitue un modèle de choix dans l'étude des diverses fonctions cellulaires. L'intestin adulte chez les mammifères supérieurs se divise en deux grands compartiments, soit l'intestin grêle et le gros intestin. Ce dernier est lui-même divisé en plusieurs sous-compartiments qui sont le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant, le colon sigmoïde, le rectum et le canal anal. Pour sa part, l'intestin grêle comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon (MARIEB, 1998). Un grand nombre de différences physiologiques et morphologiques caractérisent chacun de ces compartiments autant au niveau du développement que chez l'adulte. Toutefois, dans le cadre de mes travaux, je m'attarderai plus particulièrement au cas de l'intestin grêle au sein duquel on retrouve l'axe crypte-villosité comme unité fonctionnelle (BEAULIEU, 1992; BEAULIEU, 1997).

1.1 L'axe crypte-villosité

La muqueuse de l'intestin grêle présente, afin d'augmenter sa surface d'absorption, des projections digitiformes appelées villosités. Au niveau du duodénum, ces villosités sont plus longues et de formes élargies puis elles diminuent de taille et deviennent plus étroites lorsqu'on se déplace vers l'extrémité postérieure de l'intestin grêle. Partout entre les villosités, on retrouve des structures tubulaires creuses appelées cryptes de Lieberkühn (MARIEB, 1998). On retrouve en moyenne six cryptes entourant chaque villosité. C'est l'ensemble de ces deux structures (cryptes et villosités) qui constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle que l'on appelle l'axe crypte-villosité (Figure 1). Le revêtement de cet axe crypte-villosité est constitué d'un épithélium simple cylindrique reposant sur une lamina propria (compartiment mésenchymateux) à l'intérieur de laquelle on retrouve entre autres des fibroblastes et des myofibroblastes. Cette lamina propria est impliquée, via la sécrétion de plusieurs types de facteurs de croissances, au niveau de la régulation de certaines fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal (LEEDHAM & al., 2005). À l'interface de l'épithélium et du mésenchyme, on retrouve la lame basale, soit un mince feuillet composé de divers éléments de matrice extracellulaire tels que des réseaux de collagène de type IV et de laminines auxquels s'associent des protéoglycans et d'autres glycoprotéines comme la fibronectine (LEBLOND & INOUE, 1989; BEAULIEU, 1997). La lame basale contribue grandement à l'interaction entre les compartiments épithéliaux et mésenchymateux (ADAMS &

WATT, 1993). C'est toutefois l'épithélium qui est principalement impliqué dans la fonctionnalité de l'intestin grêle.

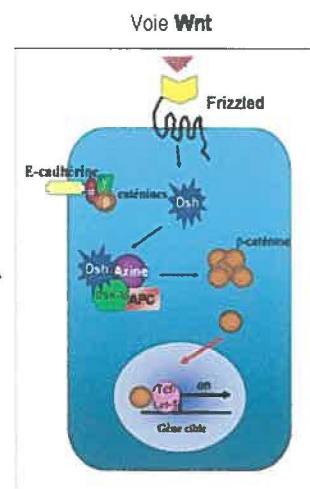
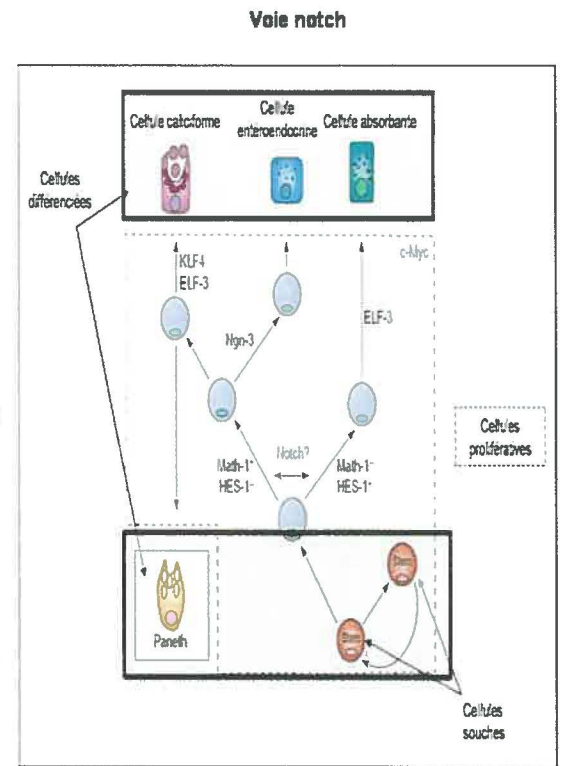
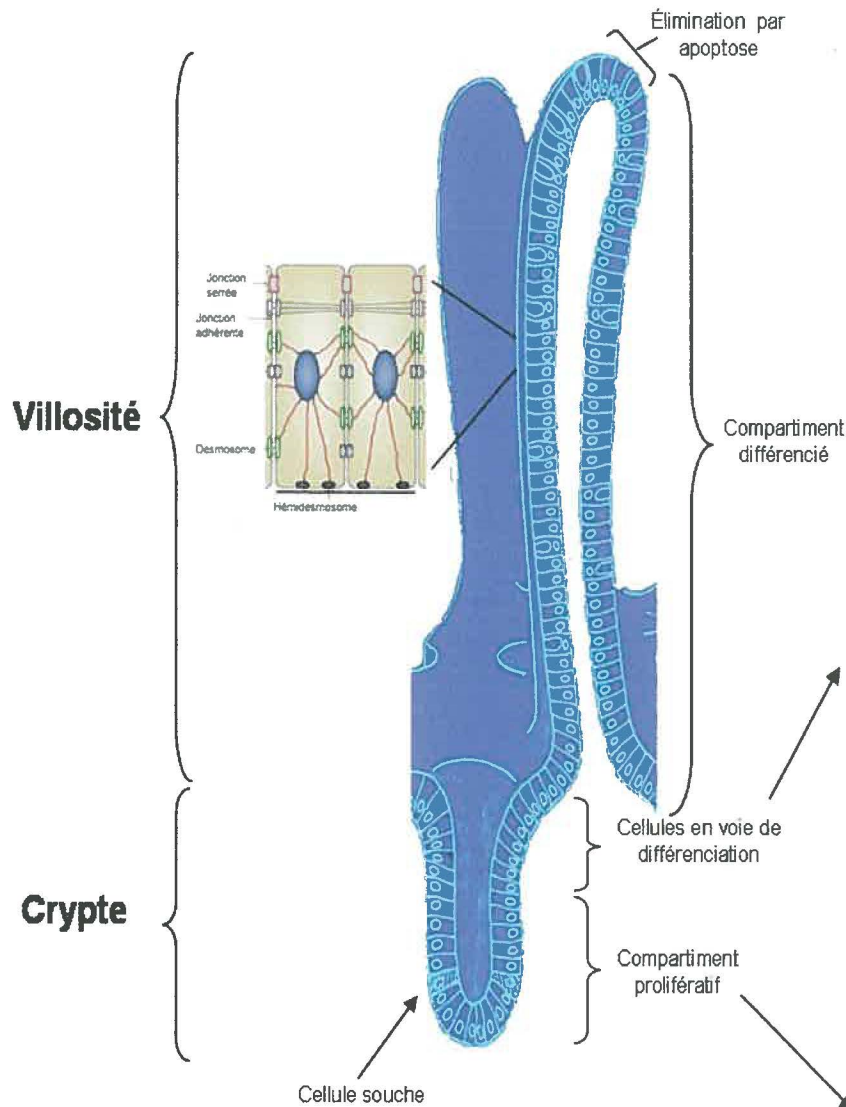
1.2 L'épithélium de l'intestin grêle

Au niveau de la surface luminale de l'intestin grêle, on retrouve un épithélium simple composé de cellules cylindriques dont la grande majorité sont des cellules absorbantes appelées entérocytes. Ces cellules sont assemblées, sous forme d'épithélium en feuillet simple, grâce à différents complexes de jonctions cellulaires dont les jonctions serrées (*zonula occludens*), les jonctions adhérentes (*zonula adherens*) et les desmosomes (*macula adherens*). Ces complexes de jonctions cellulaires sont impliqués principalement dans la gestion de la perméabilité de l'épithélium ainsi que dans l'établissement de la polarité des cellules qui le composent (Figure 1) (GUMBINER, 1996). La composition et les caractéristiques de cet épithélium varient selon un patron bien particulier le long de l'axe crypte-villosité. C'est au niveau du compartiment de la crypte que l'on retrouve les cellules épithéliales prolifératives. Ces cellules sont issues de la division asymétrique des cellules souches pluripotentes situées à la base des cryptes (Figure 1) (LEEDHAM & al., 2005). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle majeur dans la régulation de la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal, notamment au niveau de l'établissement de la population de cellules souches épithéliales des cryptes intestinales durant la morphogenèse (VIDRICH & al., 2003) (Figure 1). Ces cellules prolifératives

migreront de manière ascendante le long de l'axe crypte-villosité et entameront un processus de différenciation au niveau du tiers supérieur du compartiment cryptal. Les cellules en voie de différenciation perdront ainsi leur capacité à proliférer et atteindront leur état de différenciation terminale une fois rendues à la base du compartiment villositaire (BEAULIEU, 1999) (Figure 1). Quatre principaux types cellulaires émergeront de ce processus de différenciation cellulaire et les ratios de cellules de chaque type sont finement régulés via la voie de signalisation Notch, une cascade décisionnelle du devenir cellulaire (SANCHO & al., 2003). Ces quatre principaux types cellulaires sont les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (VIDRICH & al., 2003) (Figure 1). Les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle, à l'exception des cellules de Paneth, continueront leur processus de migration ascendante le long de l'axe crypte-villosité jusqu'à l'apex de la villosité où elles sont éliminées par apoptose. Pour ce qui est des cellules de Paneth, celles-ci migrent plutôt vers le fond de la crypte (Figure 1) (MARIEB, 1998). C'est par l'ensemble de ces processus de prolifération, de migration, de différenciation et d'élimination par apoptose des cellules de l'épithélium de l'intestin grêle que se fera le renouvellement de ce tissu sur une base régulière, soit à tous les trois jours chez la souris et sur une période de trois à cinq jours chez l'humain (CALVERT & POTHIER, 1990).

Figure 1. L'axe crypte villosité

L'axe crypte-villosité constitue l'unité fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin grêle et est composé de deux compartiments distincts, soit la crypte (portion inférieure) et la villosité (portion supérieure). On retrouve dans la villosité des cellules matures différenciées et non prolifératives. Il s'agit en grande majorité d'entérocytes mais aussi de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Dans la crypte, on retrouve un compartiment prolifératif contenant des cellules souches pluripotentes et des cellules en division symétrique. On retrouve aussi un compartiment contenant des cellules en voie de différenciation situé au niveau du tiers supérieur de la crypte. Au fond de la crypte il y a les cellules de Paneth, qui atteignent leur état de différenciation terminale au cours d'un processus de migration descendante. La voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la prolifération et la maintenance des cellules souches de l'épithélium intestinal en plus de jouer un rôle dans la différenciation et le devenir cellulaire. La spécification du devenir cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal se fait via un patron d'expression de gènes «pro-choix» influencé par la voie Notch, qui dirigera le processus de différenciation vers les quatre principaux types cellulaires. Les cellules épithéliales sont assemblées sous forme d'épithélium simple grâce à l'intervention de complexes de jonctions cellulaires contrôlant sa perméabilité et son intégrité tissulaire. Finalement, les cellules épithéliales atteignent l'apex de la villosité dû à un phénomène de migration cellulaire ascendante puis sont éliminées par apoptose. C'est par ce système que se fait le renouvellement constant de l'épithélium intestinal.



(Image modifiée de SANCHO & al., 2003 et REYA & CLEVERS, 2005)

Tel que mentionné précédemment, l'épithélium de l'intestin grêle est impliqué au niveau de diverses fonctions telles que l'absorption des nutriments et l'acheminement de ceux-ci vers la circulation sanguine, la sécrétion d'enzymes digestives, de mucus et d'hormones ainsi que la protection contre les maladies infectueuses. C'est en fait via la participation des quatre principaux types cellulaires présents au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle que chacune de ces tâches sont accomplies.

Les fonctions d'absorption des nutriments et de sécrétion de certaines enzymes digestives sont assurées par les entérocytes qui constituent le type cellulaire retrouvé en grande majorité au sein de l'épithélium de l'intestin grêle. Les entérocytes pleinement différenciés sont des cellules polarisées dont la membrane plasmique est divisée en deux grands domaines, soit le domaine apical et le domaine basolatéral (MASSEY-HARROCHE, 2000). C'est au niveau du domaine apical que l'on retrouve les microvillosités constituant la bordure en brosse. On y retrouve aussi divers transporteurs impliqués dans l'absorption des nutriments (LEIBACH & GANAPATHY 1996) en plus de retrouver certaines enzymes digestives telles que la sucrase-isomaltase (SI), la lactase-phlorizine hydrolase (LPH), la maltase-glucoamylase et la tréhalase (TRABER, 1999). Les cellules caliciformes sont pour leur part, responsables de la sécrétion de mucus composé de glycoprotéines sulfatées appelées sulfomucines (MÉNARD, 1994), au niveau de la lumière intestinale afin de protéger l'épithélium de l'abrasion en plus de faciliter le passage du bol alimentaire dans le tube digestif (MARIEB,

1998). Les cellules entéroendocrines sont impliquées dans la sécrétion d'hormones peptidiques telles que la somatostatine, l'entérogucagon, la sécrétine, cholécystokinine et la neurotensine de manière endocrine ou paracrine (MÉNARD, 1994; LEEDHAM & al. 2005). Finalement, les cellules de Paneth libèrent le lysozyme, une enzyme antibactérienne protégeant l'intestin grêle contre certaines bactéries (MARIEB, 1998).

2. La voie de signalisation BMP

Les facteurs Bone morphogenetic proteins (BMPs) ont été originellement identifiés comme étant des molécules pouvant induire, de manière ectopique, la formation de structures osseuses et de cartilages chez le rat. En effet, c'est en 1965 que le groupe de Urist identifia l'activité BMP et proposait qu'un facteur inconnu pouvait induire la formation d'une structure osseuse *in vivo* au niveau d'un tissu musculaire (BALEMANS & VAN HUL, 2002). Toutefois, ce n'est que vers la fin des années 1980 que les facteurs BMP-2, BMP-3 et BMP-4 furent identifiés comme étant ces protéines capable d'induire la formation d'os et de cartilages (WOZNEY & al., 1988). De nos jours, il y a plus de 30 membres connus de la famille BMP, classés à l'intérieur de différents sous-groupes selon leurs ressemblances structurales (BALEMANS & VAN HUL, 2002). La famille BMP fait elle-même partie de la superfamille du TGF β , qui englobe aussi d'autres familles telles que les Activines/Inhibines, les TGF β s et l'AMH. Les BMPs sont responsables de la régulation de la croissance et de la différenciation de lignées de

chondroblastes et d'ostéoblastes *in vitro* (KAWABATA & al., 1998) mais constituent aussi des facteurs primordiaux lors processus d'ossification endochondrale dans un contexte *in vivo* (BALEMANS & VAN HUL, 2002). De plus, les facteurs BMPs sont de plus en plus reconnus comme étant des protéines multifonctionnelles impliquées dans un large champ d'activités biologiques et ce au niveau de divers types cellulaires incluant les leucocytes, les cellules neuronales, les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales (CHEN & al, 2004; DEININGER & al, 1995). Les facteurs BMPs sont reconnus pour réguler des phénomènes tels que la croissance et la prolifération cellulaire, la différenciation, le chimiotactisme et l'apoptose chez ces types cellulaires. Les BMPs sont aussi impliqués, au niveau du développement de l'organisme, dans la morphogenèse d'une variété de tissus et d'organes.

2.1 Les facteurs BMPs

Les BMPs sont des protéines synthétisées sous forme de gros précurseurs d'environ 400 à 525 acides aminées qui ensuite s'associent sous forme d'homodimères. Avant d'être sécrétés, ces facteurs subiront un clivage protéolytique qui conduira à leur forme biologiquement active d'un poids moléculaire d'environ 30 à 38 KDa (BALEMANS & VAN HUL, 2002; YAMASHITA & al., 1996). Les facteurs BMP-2 et BMP-4 possèdent entre eux une homologie de séquence en acides aminés de 83% et ce sont les membres de la famille BMP qui sont les plus documentés (KAWABATA & al., 1998). Ce sont

aussi les facteurs BMPs que l'on retrouvera au niveau de l'intestin grêle (BITGOOD & McMAHON, 1995) et le contrôle de leur expression au niveau du mésenchyme intestinal serait modulé par des facteurs de la famille hedgehog produits par l'épithélium (MADISON & al., 2005). Les facteurs de la famille BMP agissent via la synergie de deux types de récepteurs à activité sérine/thréonine kinase, soit les récepteurs de types I et II. Trois récepteurs de type I ont été montrés comme étant capable d'interagir avec des ligands BMPs, soit les récepteurs BMPR1a, BMPR1b et ActR1a. En ce qui concerne les récepteurs de type II, il en existe aussi trois qui sont impliqués dans la signalisation via la voie BMP, soit les récepteurs BMPR-II, BMPR-IIB et ActR-II (CHEN & al., 2004). La mécanistique entourant l'interaction entre ces récepteurs et les facteurs BMPs sera toutefois discutée ultérieurement. Ces cytokines, que constituent les facteurs de la famille BMP, sont aussi identifiées comme étant des morphogènes, ce qui signifie que leur concentration active ponctuelle peut engendrer divers potentiels de détermination au niveau du développement de l'organisme (BALEMANS & VAN HUL, 2002).

2.2 Les rôles de la voie BMP

Comme ce fut mentionné plus tôt, la voie BMP est impliquée au niveau de l'induction de la formation des os et des cartilages. Toutefois, des études autant *in vitro* qu'au niveau de modèles *in vivo* ont permis de démontrer que la voie BMP était impliquée dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels

que la prolifération et la différenciation cellulaire, le chimiotactisme et l'apoptose. De plus, la voie BMP est impliquée dans la régulation de divers phénomènes fondamentaux tels que la détermination de l'asymétrie gauche-droite, la neurogénèse, la régionalisation du mésoderme et le développement de plusieurs organes comme les reins, les poumons, les testicules, les dents, le coeur et le tube digestif (BALEMANS & VAN HUL, 2002). Au cours des années antérieures, plusieurs modèles de souris ayant subi la délétion classique ou la mutation de certains facteurs ou récepteurs BMPs ont vu le jour afin d'aider à comprendre les divers rôles de ces protéines au sein de l'organisme. Une délétion des facteurs BMP-2 et BMP-4 chez la souris génère des animaux non-viables. Les embryons BMP-2 homozygotes mutants meurent entre les stades 7,5 et 10,5 jours embryonnaires dû à une déficience du développement cardiaque dans la cavité exocoelomique (ZHANG & BRADLEY, 1996), ce qui suggère fortement que BMP-2 est indispensable à ce niveau. Les embryons BMP-4 homozygotes mutants, pour leur part, meurent entre les stades 6,5 et 9,5 jours embryonnaires et démontrent une absence de différenciation du mésoderme (WINNIER & al., 1995). Une délétion classique du récepteur de type I BMPR1a conduit à une mort embryonnaire précoce. Les souris *BMPR1a*^{-/-} meurent au stade 9,5 jours embryonnaires des suites d'une absence de formation du mésoderme. Ceci entraîne des défauts morphologiques chez l'embryon qui sont apparents dès le stade 7,5 jours. Ainsi, la signalisation via la voie BMP impliquant la participation du récepteur BMPR1a contribue à la formation du mésoderme pendant la gastrulation (MISHINA & al., 1995). Une liste exhaustive des délétions et

doubles délétions pour la majorité des facteurs membres de la superfamille du TGF β chez la souris a été publiée en septembre 2002 dans le journal *Genesis* (ZHAO, 2002) et illustre bien les différents phénotypes obtenus à l'intérieur de ces modèles. À la lumière de ces informations concernant certains facteurs ou récepteurs associés à la famille BMP, il est clair que pour pouvoir étudier la fonction de certains de ces facteurs au niveau d'un tissu en particulier chez un organisme adulte, il serait nécessaire de procéder à la délétion de ceux-ci de manière conditionnelle. Néanmoins, certaines études cliniques ont déjà pu relier l'implication du récepteur BMPRIa dans certaines pathologies humaines dans lesquelles celui-ci se trouve muté. Par exemple, le syndrome JPS est caractérisé par l'apparition de polypes au niveau du tube intestinal chez des patients en bas âge et présentant de haut risques de développer un cancer du colon. Le syndrome JPS est en fait causé, dans 38% des cas, par une mutation conduisant à une forme tronquée ou à une altération non-sens (C124R et C376Y) du récepteur BMPRIa de ces patients (ZHOU & al., 2001). La plupart du reste des cas de JPS en Amérique du nord sont attribuables à une mutation du gène codant pour la protéine Smad-4 (ZHOU & al., 2001).

2.3 Signalisation via la voie BMP

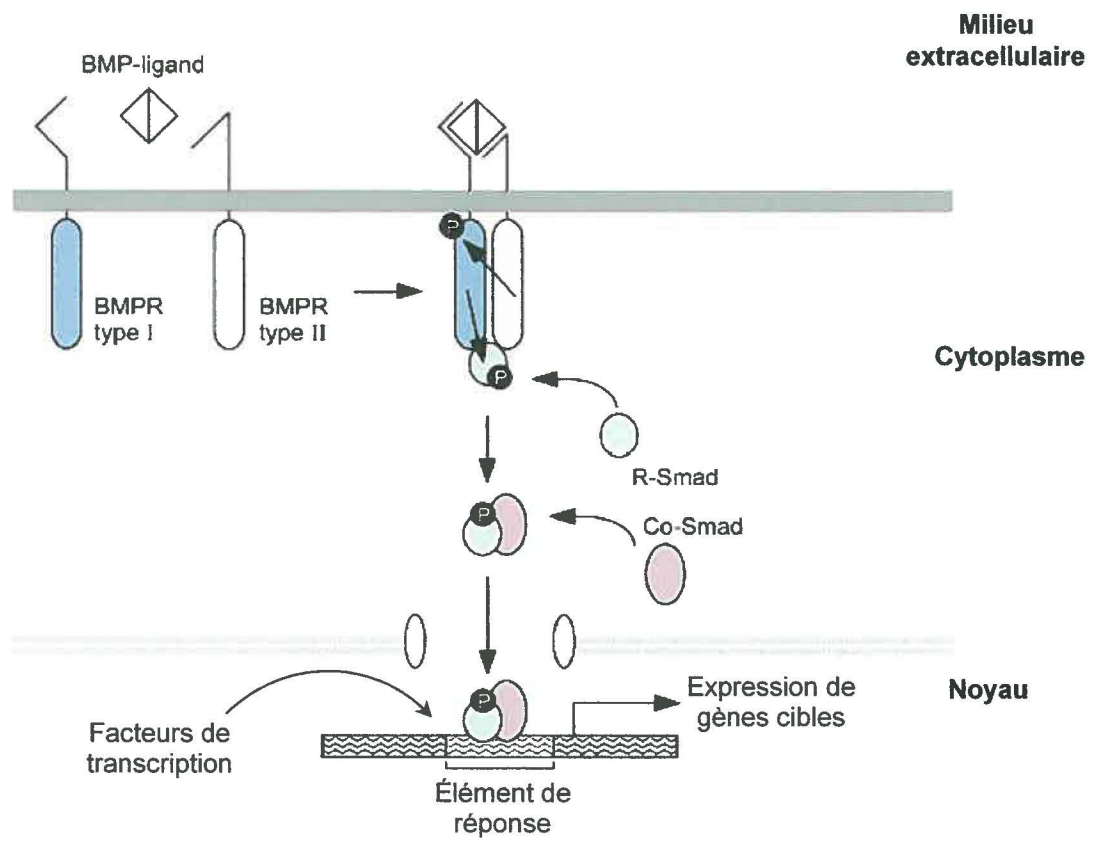
Comme il le fut mentionné précédemment au cours de cette section, les facteurs BMPs, qui sont des cytokines actives sous forme d'homodimères, transmettent leurs signaux vers le milieu intracellulaire via la participation des

récepteurs à activité sérine/thréonine kinase BMP de types I et II. C'est à cause de cet arrangement dimérique que les ligands BMPs parviennent à former des complexes Ligand / BMPR-I / BMPR-II au niveau de la membrane plasmique. Contrairement aux autres sous-classes de la superfamille du TGF β , les facteurs BMPs ont une plus grande affinité pour le récepteur de type I en présence que pour le récepteur de type II. Donc, le ligand BMP reconnaît et lie d'abord son récepteur de type I puis le complexe ainsi formé adopte une conformation favorable au recrutement du récepteur de type II en présence. La liaison des domaines extracellulaires des deux types de récepteurs rapproche leur domaine à activité kinase respectif situé au niveau de leur portion cytoplasmique. Le domaine à activité kinase du récepteur de type II est dit constitutivement actif et est responsable de l'activation par phosphorylation du récepteur de type I. À l'instar du récepteur de type II, le récepteur de type I possède une séquence résiduelle SGSGSG, plus connue sous le nom de motif GS, tout juste en N-terminal de son domaine kinase, sur laquelle il y aura phosphorylation par le récepteur de type II afin qu'il y ait activation du domaine à activité kinase en question (SHI & MASSAGUÉ, 2003) (Figure 2). La transduction du signal au niveau intracellulaire peut être faite par la suite via l'implication des facteurs Smads (SHI & MASSAGUÉ, 2003). Identifiés à la base chez la drosophile en tant que facteurs MADs, des orthologues de cette famille ont rapidement été identifiés chez beaucoup d'autres espèces, notamment chez les vertébrés (DERYNCK & ZHANG, 1996). Les facteurs Smads sont regroupés en trois groupes distincts, soit les R-Smads, reconnus pour interagir

Figure 2 Mécanisme d'activation des récepteurs BMP et la voie des Smads

Les facteurs BMP sous forme de dimères lient les récepteurs sérine/thréonine kinase de type I et type II au niveau de la membrane plasmique. Par la suite, le récepteur de type II transphosphoryle le récepteur de type I pour ainsi l'activer. Le récepteur de type I actif recrute et phosphoryle les facteurs R-Smad au niveau cytoplasmique. Ces derniers vont ensuite s'associer à Smad-4 (Co-Smad) et transiter vers le noyau où ils vont moduler l'activité de gènes cibles en coopération avec divers facteurs de transcription.

(Image et modifiée de BALEMANS & VAN HUL, 2002)



avec les complexes de récepteurs, le co-Smad (Smad-4 uniquement), qui constitue un partenaire d'interaction commun à tous les R-Smads et finalement les I-Smads (Smad-6 et 7). Ces derniers sont en fait des régulateurs négatifs de cette voie de signalisation intracellulaire puisqu'ils préviennent l'interaction des R-Smads avec les complexes de récepteurs actifs en plus de contribuer au processus de dégradation de certains facteurs clés par le protéasome 26S (SHI & MASSAGUÉ, 2003).

Les R-Smads spécifiquement impliqués dans la signalisation intracellulaire via la voie BMP sont les facteurs Smad-1, 5 et 8. Contrairement aux autres types de Smad, ces facteurs possèdent un motif caractéristique d'acides aminés SSXS situé à leur extrémité C-terminale et qui est phosphorylé par le récepteur de type I actif. Cette phosphorylation contribuera en fait à activer le R-Smad. Le recrutement de ces facteurs au niveau des récepteurs BMP actifs se ferait via l'interaction de certains motifs de la structure tertiaire des R-Smads et des récepteurs de type I phosphorylés (CHEN & al., 1998). Une fois phosphorylés, les R-Smads verront leur interaction avec les complexes de récepteurs actifs déstabilisée et seront ainsi disponibles pour interagir avec la machinerie d'importation nucléaire (XU & al., 2000). Les R-Smads et Smad-4 (co-Smad) possèdent des domaines d'homologie structurale conservés appelés MH1 et MH2 qui sont impliqués au niveau de maintes interactions avec divers facteurs au cours des événements subséquents. Le domaine MH1 des R-Smad et de Smad-4 comprend un motif de liaison à l'ADN et serait impliqué au niveau du mécanisme

d'importation nucléaire en plus d'exercer un effet répresseur sur le domaine MH2 à l'intérieur de la même protéine. Chez les I-Smads, on retrouve aussi un domaine ressemblant au domaine MH1 des R-Smads et de Smad-4 mais, toutefois, ce domaine est incapable de lier l'ADN. Le domaine MH2 est pour sa part très bien conservé à l'intérieur de tous les membres de la famille des Smads. C'est au niveau de ce domaine qu'on observe l'interaction avec le récepteur de type I actif puisque le domaine MH2 contient le motif SSXS dans son extrémité C-terminale. Ensemble, les domaines MH1 et MH2 interagissent aussi au niveau du noyau avec une multitude de protéines, affectant ainsi la transcription des gènes cibles de cette voie de signalisation (SHI & MASSAGUÉ, 2003). En absence de signal BMP, les R-Smads sont localisés au niveau du cytoplasme, les I-Smads sont au noyau tandis que Smad-4 se trouve réparti autant au niveau nucléaire que cytoplasmique (SHI & MASSAGUÉ, 2003; PIERREUX & al., 2000). Suite à la phosphorylation des R-Smad en réponse à l'activation des complexes de récepteurs, ces facteurs vont s'associer à Smad-4 au niveau cytoplasmique. Ensuite, ils effectuent une translocation vers le noyau ou bien s'exporter directement vers le noyau pour lier Smad-4 à cette endroit (KURISAKI & al., 2001). Les complexes R-Smad/Smad-4 vont lier l'ADN de manière séquence spécifique via l'interaction des domaines MH1 avec un élément de liaison des facteurs Smads appelé SBE au niveau de l'ADN (DENNLER & al., 1998). Autant l'activation que la répression des gènes cibles de cette voie de signalisation sont régis par les mêmes complexes R-Smad/Smad-4. Toutefois, c'est selon la présence de différents partenaires d'interaction, variant selon les

différents types cellulaires que sera effectué le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs transcriptionnels, selon le cas. En fait, les facteurs Smads doivent coopérer ensemble ainsi qu'avec d'autres protéines liant l'ADN afin de générer une réponse transcriptionnelle spécifique (SHI & MASSAGUÉ, 2003). Certains de ces facteurs liant l'ADN sont ubiquitaires, soit présents et médiant la même réponse dans tous les types cellulaires, tandis que d'autres sont restreints à un type cellulaire en particulier, donnant ainsi une réponse transcriptionnelle spécifique (SHI & MASSAGUÉ, 2003).

2.4 Régulation de la voie BMP

Il existe deux niveaux de régulation de la voie BMP, soit une régulation faite au niveau extracellulaire et l'autre se déroulant à l'intérieur même de la cellule. Les facteurs BMPs sont sécrétés dans le milieu extracellulaire sous forme de dimères actifs. L'activité de ces facteurs est régulée au niveau extracellulaire par la présence de protéines appelées antagonistes. Les antagonistes des facteurs BMP sont des protéines qui lient spécifiquement et forment des complexes inactifs avec les BMPs avant que ceux-ci puissent lier leurs récepteurs. Le produit du gène *Noggin*, qui constitue un des antagonistes de BMP les plus connus, a d'abord été identifié comme étant une molécule produite par le tissu organisateur chez l'embryon de *Xenopus*. *Noggin* antagonise l'action de BMP-4 chez l'embryon et ainsi induit la dorsalisation du mésoderme en empêchant sa ventralisation par la signalisation BMP. Les antagonistes sont présents selon des gradients de

concentrations qui eux-mêmes établissent des gradients de facteurs BMPs actifs à l'intérieur de l'organisme. Noggin peut en fait directement lier les facteurs BMP-2 et BMP-4 avec une haute affinité et empêcher ceux-ci de rejoindre leurs récepteurs. Il peut aussi lier BMP-7 mais avec une plus faible affinité. Il existe aussi plusieurs autres antagonistes, comme Chordin, qui, tout comme Noggin, peut inactiver les facteurs BMP-2 et BMP-4 mais toutefois avec un potentiel variable selon le stade de développement ou le contexte biologique à l'intérieur duquel on le retrouve (KAWABATA & al., 1998). La signalisation via la voie BMP est aussi régulée au sein même de la cellule, à commencer par la membrane plasmique où la protéine BAMBI agit comme pseudo-récepteur BMP et exerce une régulation négative sur cette signalisation. En fait, BAMBI ressemble, au niveau de sa séquence, à un récepteur de la superfamille du TGF β de type I qui, toutefois, ne possède pas de domaine kinase intracellulaire. Ainsi, l'augmentation de l'expression de BAMBI contribue à une augmentation de la compétition entre ce pseudo-récepteur et le véritable récepteur de type I pour la formation d'un complexe avec le récepteur de type II. Une forte présence de BAMBI conduit ainsi à une diminution globale de la signalisation via la voie BMP (VON BUBNOFF & CHO, 2001). Il semblerait que BAMBI soit en fait impliqué dans une boucle de rétro-contrôle négatif de la signalisation BMP puisque son expression est BMP-dépendante. En effet, une surexpression de BMP-4 conduit à l'augmentation de l'expression de BAMBI (GROTEWOLD & al., 2001), tandis que la perte de l'expression de BMP-2 entraîne une chute d'expression de BAMBI (TSANG & al., 2000). Au niveau intracellulaire, les I-Smads jouent aussi un rôle

de régulateurs négatifs de la signalisation BMP. Ce groupe de Smads constitué en fait de Smad-6 et Smad-7, lient de manière stable la portion cytoplasmique des récepteurs BMPs de type I et ainsi empêcher l'activation par phosphorylation de R-Smads (SOUCHELNYTSKYI & al., 1998). De plus, Smad-6 peut aussi inhiber la signalisation BMP par son implication dans une compétition avec Smad-4 pour la liaison des R-Smad phosphorylés, générant ainsi des complexes R-Smad/I-Smad inactifs (HATA & al., 1998). L'expression des I-Smads semble aussi faire partie d'une boucle de rétro-contrôle négatif puisque des éléments de réponse BMP (BRE) ont été retrouvés à l'intérieur du promoteur de Smad-6 (ISHIDA & al., 2000). En plus de faire compétition à certains facteurs clés de la signalisation BMP, les I-Smads, plus spécifiquement Smad-7, sont aussi impliqués dans la régulation des taux de ces facteurs clés par dégradation via le protéasome 26S. En absence de signalisation BMP, Smad-7 réside au niveau du noyau, en association avec l'acétyl-transférase p300. Cette dernière acétylera certains résidus lysines de Smad-7, protégeant ainsi ce dernier de l'ubiquitination. Smad-7 est aussi associé aux Smurf1 et 2, des ubiquitine-ligases de type E3. Suite à un signal BMP, Smad-7 quitte le noyau, se dissociant alors de p300, et interagit avec les récepteurs de type I actifs en entraînant Smurf1, 2 à cet endroit. Smurf1, 2 procède à l'ubiquitination des récepteurs actifs, ce qui va conduire à la dégradation de ceux-ci via le protéasome 26S (SHI & MASSAGUÉ, 2003). Finalement, divers groupes rapportent peu à peu d'autres protéines qui pourraient elles aussi contribuer à la régulation négative de la signalisation BMP au niveau intracellulaire. Par exemple, Tob bloquerait l'activité transcriptionnelle des

complexes protéiques impliquant les Smads-1, 5 et 8 au niveau du noyau (YOSHIDA & al., 2000). De plus, il existerait des phosphatases encore non-identifiées qui seraient responsable de la terminaison de la signalisation BMP par la déphosphorylation des récepteurs et des R-Smads actifs (RANDALL & al., 2002).

3. *Utilisation de la souris comme modèle expérimental*

Au niveau de la recherche biomédicale, la souris peut être utilisé comme cobaye afin de permettre la récolte de données fonctionnelles dans un contexte *in vivo* (BOCKAMP & al., 2002). Parmi les principaux avantages qu'offre la souris au sein de ce domaine de recherche, on retrouve dans un premier temps le court cycle de vie de cet animal (VAN DER WEYDEN & al. 2002). Avec un temps de gestation d'environ 21 jours, une capacité à se reproduire après seulement 30 jours et une durée de vie d'environ deux ans, la souris constitue un modèle intéressant dans la mesure où les différents stades du développement ainsi que les stades néonatal, postnatal et adulte sont atteignables dans de courts délais. Le génome de la souris, actuellement séquencé en très grande partie, est relativement facile à manipuler sur le plan moléculaire et démontre une très grande homologie avec le génome humain (VAN DER WEYDEN & al. 2002). Au cours des dernières années, le monde de la recherche a vu l'émergence d'un grand nombre de nouveaux modèles de souris génétiquement modifiées qui fournissent aux

chercheurs des outils fort intéressants dans leur quête de la compréhension de divers mécanismes moléculaires impliqués dans diverses pathologies humaines.

Parmi les modifications génétiques les plus courantes retrouvées chez la souris, on note la transgénèse et la délétion spécifique d'un gène, plus souvent connu sous le nom de « knockout ». La transgénèse consiste en l'insertion de plusieurs copies d'un segment d'ADN exogène au sein même du génome de l'animal. Une fois intégré au génome, le transgène sera exprimé ou encore préviendra l'expression d'un autre gène pour ainsi fournir une multitude d'informations par rapport à un phénotype donné (SHULDINER A.R., 1996). Les modèles de souris transgéniques sont souvent utilisés afin de simuler certaines pathologies ou pour tester de nouvelles thérapies. Par contre, la délétion d'un gène par ciblage génétique repose plutôt sur des méthodes visant à remplacer une portion d'un gène spécifique d'intérêt par un segment d'ADN exogène donné (souvent une cassette de résistance à une drogue) ou encore visant à supprimer tout simplement cette portion du gène d'intérêt afin d'en altérer l'expression. Les techniques de délétion par ciblage génétique sont généralement employées dans le cadre de la génération de modèles de souris présentant des pathologies génétiques récessives à l'intérieur desquelles une seule ou même les deux allèles d'un gène endogène doivent être supprimées afin qu'il puisse y avoir émergence du phénotype recherché. De plus ce type de manipulation génétique peut contribuer à clarifier la mécanistique de bon nombre de phénomènes biomoléculaires au sein même de l'organisme (MAJZOUB & MUGLIA, 1996).

Il y a toutefois certains facteurs à considérer lorsqu'il est question de générer un modèle animal à l'intérieur duquel se trouve une délétion génétique. En effet, puisque la modification génétique est présente à l'intérieur du génome de l'animal dès la conception, il est entre autre possible que la délétion en question amène une mort prématurée de l'organisme à un stade embryonnaire ou néonatal. C'est pourquoi l'amélioration des technologies entourant les techniques de délétion par ciblage génétique passe par la capacité d'induire l'invalidation d'un gène d'intérêt à un temps spécifique après la conception et/ou à l'intérieur d'un tissu spécifique (MAJZOUN & MUGLIA, 1996). Ce principe de contrôle spatio-temporel sur l'invalidation d'un gène d'intérêt est connu sous le nom de délétion conditionnelle. Cette appellation est due au fait que la délétion ne peut avoir lieu que si une condition bien particulière est respectée au niveau moléculaire à un temps et/ou à l'intérieur d'un tissu spécifique. Afin de réaliser cette approche, certains outils génétiques ont été développés, tel que le système Cre/LoxP (BOCKAMP & al. 2002).

4. Le système Cre/LoxP

Basé sur la capacité de la recombinaise Cre, isolée du bactériophage P1, à reconnaître et recombiner des séquences d'ADN spécifiques appelées LoxP, le système Cre/LoxP permet d'exciser ou même d'inverser des segments d'ADN retrouvés entre ces séquences LoxP, selon l'orientation de celles-ci, à l'intérieur

du génome d'une cellule. Ces séquences LoxP comportent en fait un centre de huit paires de bases flanqué de deux segments de 13 paires de bases générant un palindrome inversé (Figure 3). C'est la séquence centrale asymétrique qui dicte l'orientation du site LoxP. C'est donc au niveau de ces séquences LoxP que la reconnaissance site-spécifique entre l'ADN et la recombinaise Cre aura lieu. Ainsi, un segment d'ADN flanqué de deux séquences LoxP orientées dans le même sens au niveau d'un chromosome donné sera excisé, tandis qu'un segment d'ADN se trouvant entre deux séquences LoxP ayant des orientations opposées sera inversé suite à l'action de la recombinaise Cre (TYMMS & KOLA, 2001).

Une des applications fort intéressante du système Cre/loxP réside dans sa capacité de générer la délétion par ciblage génétique d'un gène d'intérêt de manière conditionnelle (BOCKAMP & al., 2002). En fait, l'excision d'une séquence d'ADN essentielle à l'expression adéquate d'un gène est possible par l'insertion de deux séquences LoxP, orientées dans le même sens de part et d'autre de cette séquence à l'intérieur du génome d'un organisme. L'expression de la recombinaise Cre, sous l'influence d'un promoteur inductible et/ou tissu spécifique conduira à l'excision selon le contrôle spatio-temporel qu'exerce ce promoteur. Cette recombinaison conduira à l'invalidation fonctionnelle du gène en question selon les conditions voulues.

5. *Projet de recherche et hypothèse*

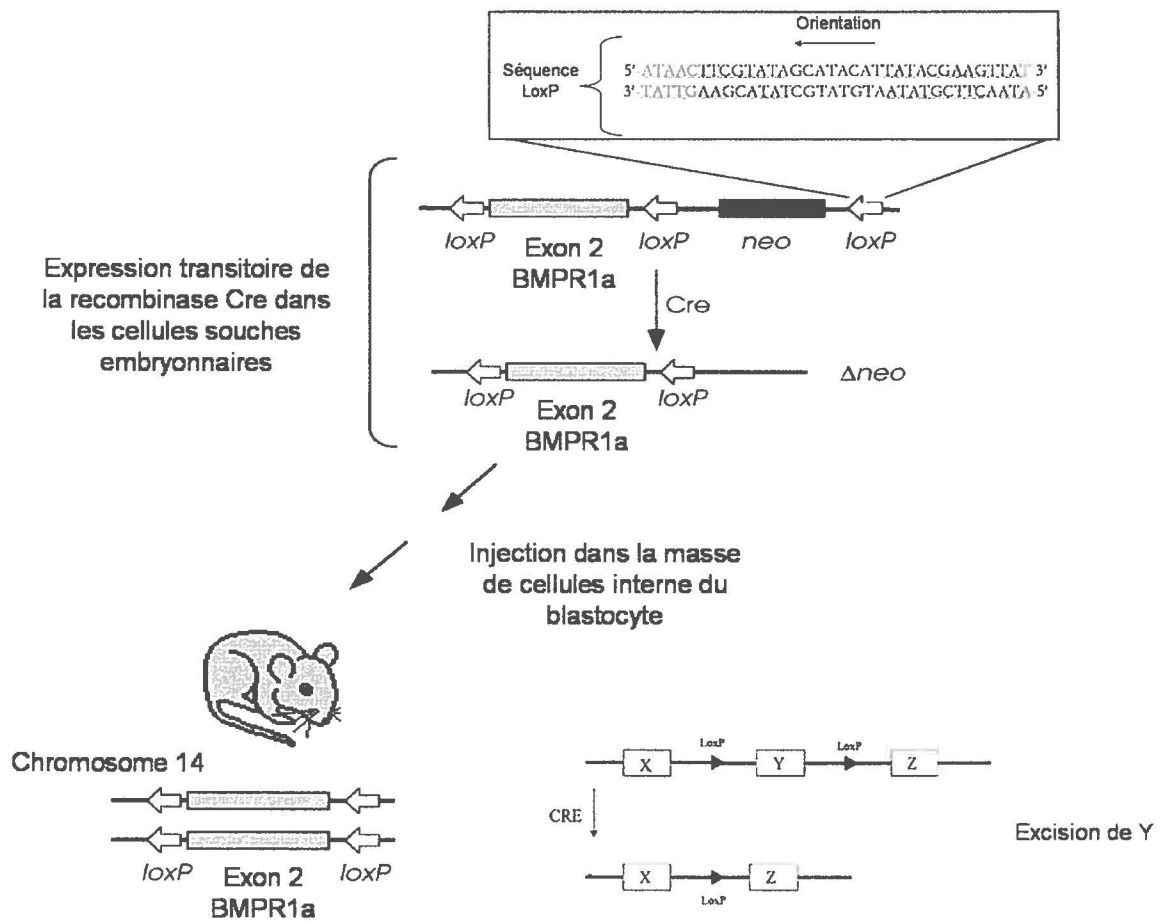
À la lumière de ce qui a été mentionné au cours de cette introduction, il est évident que la voie BMP offre un potentiel de recherche intéressant quant à ses diverses fonctions au niveau de la biologie cellulaire chez un organisme adulte. De plus, considérant que l'épithélium intestinal constitue un modèle intéressant au niveau de la recherche en biologie cellulaire, l'étude de l'impact de l'abolition de la signalisation BMP au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris pourrait nous fournir plusieurs réponses concernant les divers rôles de cette voie de signalisation dans un contexte *in vivo*. En effet, il serait intéressant de voir si le fait d'inhiber la signalisation BMP pourrait avoir un impact sur les diverses fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal mais aussi au niveau du maintien de l'intégrité tissulaire globale de l'intestin grêle. C'est aussi sans compter le fait que la voie BMP a récemment été reliée directement avec certaines pathologies du tube digestif humain (ZHOU & al., 2001; HOWE & al., 2001). Toutefois, considérant les diverses fonctions des facteurs BMP au niveau du développement précoce de l'embryon ainsi que les résultats des différentes études d'inactivation génétique de ces facteurs réalisées chez la souris, il semble clair que si nous voulons procéder à l'étude fonctionnelle de la voie de signalisation BMP au niveau de l'épithélium intestinal de la souris via la perte de cette signalisation, notre délétion génétique devra être faite de manière conditionnelle. De plus, si on se rapporte dans un contexte intestinal concernant la voie BMP, on note l'expression des facteurs BMP-2 et BMP-4 (BITGOOD & McMAHON, 1995).

Comme il le fut rapporté plus tôt, lorsqu'il y a plusieurs facteurs BMP exprimés à l'intérieur d'un même tissu, il y a possibilité, suite à la perte de l'expression d'un de ces facteurs, qu'il y ait compensation par un autre de ces facteurs. Il y a donc deux possibilités à envisager si on veut «couper» la signalisation BMP au niveau d'un organisme *in vivo*. Premièrement, on pourrait générer une double délétion des facteurs BMP-2 et BMP-4 ou, deuxièmement, procéder à l'invalidation du récepteur de type I présent au niveau de l'épithélium intestinal. Cette deuxième possibilité est moins compliquée puisqu'il n'y a qu'un gène impliqué. Mon projet de recherche vise à générer un modèle murin à l'intérieur duquel on retrouve une délétion spécifique à l'épithélium intestinal du récepteur BMPRIa. Cette délétion sera faite de manière conditionnelle via l'utilisation du système Cre/LoxP. À partir de ce modèle, il nous est possible d'étudier les différentes conséquences de notre délétion au niveau des différentes fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal en plus des conséquences au niveau du maintien de l'intégrité tissulaire de l'intestin sans pour autant affecter le reste de l'organisme. À l'intérieur du génome de nos souris expérimentales, on retrouvera deux séquences de type LoxP orientées dans le même sens et ce de part et d'autre de l'exon 2 du gène codant pour le récepteur de type I BMPRIa retrouvé sur le chromosome 14 (MISHINA & al, 2002) (Figure3). Afin de remplir la condition nous permettant d'avoir une délétion de *BMPRIa* spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal, nous avons dirigé l'expression de la recombinaise Cre à l'aide du promoteur de la villine, une protéine d'empaquetage de l'actine spécifique à l'épithélium intestinal. L'utilisation de ce promoteur dirigeant l'expression de la recombinaise

Cre nous permet d'avoir une expression de celle-ci dès le stade 12.5 jours embryonnaire et ce spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal (MADISON & al., 2002). L'impact de cette délétion du récepteur BMPR1a au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris a été étudié plus particulièrement dans le jéjunum et chez l'animal adulte. Étant donné les différents rôles de la voie BMP mentionnés au cours de cette introduction, nous avons établi une hypothèse de recherche à l'intérieur de laquelle nous proposons que la délétion conditionnelle du récepteur BMPR1a au niveau de l'épithélium intestinal pourrait entraîner des conséquences au niveau de la prolifération cellulaire, de la différenciation cellulaire ainsi que de la migration cellulaire. Afin de valider notre hypothèse de recherche, nous allons d'abord effectuer des observations au niveau de la morphologie de la muqueuse intestinale afin de récolter des indices pouvant conduire à l'identification des mécanismes moléculaires perturbés suite à l'abolition de la signalisation BMP. Par la suite, nous allons tenter d'identifier les différents gènes dont la régulation normale de leur expression se voit compromise suite à notre délétion. Finalement, nous souhaitons pouvoir dresser un modèle schématique représentant l'ensemble des rôles de la voie de signalisation BMP dans le maintien de l'intégrité tissulaire de l'épithélium intestinal.

Figure 3. Insertion des séquences LoxP au niveau du gène *BMPRIa*

Les séquences LoxP sont issues du génome du bactériophage P1 et se retrouvent sous forme de palindromes inversés à l'intérieur desquels on retrouve, au centre, une séquence asymétrique de 8 paires de bases dictant leur orientation. Les LoxP ont une longueur de 34 paires de bases et peuvent être recombinaées les unes avec les autres via l'action de la recombinaase Cre. Afin de permettre l'excision de l'exon 2 du gène codant pour le récepteur de type I BMPRIa, on procède à l'insertion de séquences LoxP orientées dans le même sens de part et d'autre de cet exon. Ces séquences LoxP seront présentes partout à la grandeur du génome (tous les types cellulaires) même si notre délétion sera faite spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal. L'élimination de l'exon 2 du gène codant pour *BMPRIa* est suffisante afin d'invalider complètement la fonction de ce récepteur. (Image modifiée de SAUER, 1998 et TYMMS & KOLA, 2001)



II - Matériel et méthodes

1. Les lignées de souris utilisées et les différents croisements

Les différentes lignées de souris utilisées dans le cadre de nos expériences sont illustrées à l'intérieur du tableau 1. De plus, le tableau 2 représente les différents croisements effectués entre les lignées de souris afin de générer nos souris contrôles et expérimentales. Les souris utilisées en tant que contrôles doivent avoir un génotype $BMPRIa^{LoxP/LoxP}$ ou $villine-Cre; BMPRIa^{+/+}$. D'autre part, les souris appartenant au groupe expérimental sont de génotype $villine-Cre; BMPRIa^{LoxP/LoxP}$ ou $villine-Cre; BMPRIa^{LoxP/\Delta}$. L'appellation $villine-Cre$ est employée dans le cas d'une souris ayant un génotype $villine^{Cre/+}$. Nous ne générons pas de souris $villine^{Cre/Cre}$ afin d'éviter les problèmes rattachés à l'intégration aléatoire du transgène Cre à l'intérieur d'un gène pouvant influencer le déroulement de nos expériences. Dans le cas des expériences visant à démontrer l'efficacité de notre système d'expression de la recombinaise Cre, les contrôles utilisés sont de génotype $Gtrosa26^{tm1Sor LacZ/+}$, tandis que les souris expérimentales ont un génotype $villine-Cre; Gtrosa26^{tm1Sor LacZ/+}$. Les souris de type sauvage (+/+) sont utilisées pour des fins de reproduction des souris de différentes lignées. Toutes les souris reçoivent une diète normale et sont gardées en captivité à l'unité

transgénique de l'animalerie centrale de l'Université de Sherbrooke en conformité avec les protocoles éthiques approuvés.

Tableau 1. Lignées de souris utilisées

Lignée	Race	Génotype	Source
Villine- <i>Cre</i>	C57BL/6	Villine- <i>Cre</i> /+	Dr Gummucio
<i>BMPRIa</i> ^{Fx/Fx}	SVEV	<i>BMPRIa</i> ^{LoxP/LoxP}	Dr Mishina
<i>BMPRIa</i> -S	SVEV	<i>BMPRIa</i> ^{+/Δ}	Dr Mishina
Gtrosa26 ^{tmISor}	C57BL/6	Gtrosa26 ^{tmISor LacZ/+}	Jackson Lab
Type sauvage	SVEV et C57BL/6	+/+	Jackson Lab

Tableau 2. Croisements entre les lignées de souris

Croisement	Race	Génotype voulu	Ratio mendélien
Villine- <i>Cre</i> x <i>BMPR1a</i> ^{Fx/Fx}	Hybride F1	Villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPR1a</i> ^{LoxP/+}	50%
Villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPR1a</i> ^{Fx/+} x <i>BMPR1a</i> ^{Fx/Fx}	Hybride F2	Villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPR1a</i> ^{LoxP/LoxP}	25%
<i>BMPR1a</i> -S x villine- <i>Cre</i>	Hybride F1	Villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPR1a</i> ^{+/Δ}	25%
Villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPR1a</i> -S x <i>BMPR1a</i> ^{Fx/Fx}	Hybride F2	Villine- <i>Cre</i> ; <i>BMPR1a</i> ^{LoxP/Δ}	12,5%
Gtrosa26 ^{tm1Sor} x villine- <i>Cre</i>	C57BL/6	Villine- <i>Cre</i> ; Gtrosa26 ^{tm1Sor} LacZ/+	25%
Villine- <i>Cre</i> x type sauvage	C57BL/6	Villine- <i>Cre</i>	50%
<i>BMPR1a</i> -S x type sauvage	SVEV	<i>BMPR1a</i> ^{+/Δ}	50%

2. Génotypage des souris par réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Le génotype de chaque souris est habituellement déterminé dans les jours suivant la naissance. Pour ce faire, un bout de queue est d'abord prélevé sur chaque individu. Ensuite, cet échantillon est digéré afin d'en extraire l'ADN génomique à partir duquel seront amplifiées par PCR diverses séquences caractéristiques. Les tissus sont digérés à 56°C par la protéinase K (20ul/ml) (Roche, Penzberg, Allemagne) tandis que l'extraction d'ADN est faite selon le protocole «Spin

Doctor Genomic DNA Prep» (Gerard Biotech, Oxford, OH). À partir de ces extractions d'ADN, on effectue ensuite l'amplification par PCR. Chaque mélange réactionnel contient : 2,2 µl de tampon d'amplification 10X (500 mM de KCl (Fisher, Fair Lawn, NJ), 15 mM de MgCl₂ (Fisher), 100 mM de Tris-Cl pH 8.0 (Fisher)), 0,43 µl de dNTP 10 mM (Bio Rad, Hercules, CA), 0,43 µl de chacune des amorces utilisées diluées à 100 mM (amorces synthétisées chez IDT, Coralville, IA), 1 µl d'ADN génomique et 1 µl d'enzyme d'amplification puis le volume est complété à 22 µl avec de l'eau stérile (procédure mise au point dans le laboratoire du Dr Kaestner, Philadelphie, PA). Le tableau 4 indique les différentes amorces utilisées (*BMPRIa-S*, *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et *villine-Cre* : par nos collaborateurs. *Gtrosa26*^{tm1Sor} : par Jackson Laboratory) ainsi que les conditions requises pour chaque amplification par PCR (appareil : Eppendorf Mastercycler EPgradient S). Suite à la réaction d'amplification, les produits PCR sont migrés sur un gel d'agarose 1,5% (Bio Rad), 30 minutes à un voltage de 110 V (Wide Mini-sub® Cell GT, Power-Pac 1000, Bio Rad).

Tableau 3. Informations relatives au génotypage par PCR

Génotypage	Amorces utilisées	T° app.	Nb cycles	Produits
Villine- <i>Cre</i>	5'-tgccacgaccaagtgcagcaatg-3'	55°C	35	230pb
	5'-accagagacggaaatccatcgctc-3'			
<i>BMPRIa</i> ^{Fx/Fx}	5'-gcagctgctgctgcagcctcc-3'	65°C	30	150pb, 230pb
	5'-tggctacaattgtctcatgc-3'			
<i>BMPRIa-S</i>	5'-ctctgaattctagtccacatctgc-3'	65°C	40	190pb, 280pb
	5'-agactgccttgggaaaagcgc-3'			
	5'-ggactatggacacacaatggc-3'			
Gtrosa26 ^{tm1Sor}	5'-gcgaagagttgtcctcaacc-3'	67°C	35	300pb, 550pb
	5'-ggagcgggagaaatggatatg-3'			
	5'-aaagtcgctctgagttgttat-3'			

3. Injection, euthanasie et dissection des souris

Les souris utilisées peuvent, selon le cas, recevoir deux types d'injections, soit des injections de BrdU (intrapéritonéales) et des injections de chlorhydrate de kétamine. Pour les études de prolifération et de migration cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal, nous procédons à l'injection d'une dose de 2-Bromo-déoxyuridine (BrdU) (Zymed Invitrogen, Markham, ON) de 10 µl par gramme de poids corporel de la souris. L'injection est faite 1h30 avant l'euthanasie de la souris dans le cas des études de prolifération et 48h avant l'euthanasie pour les études de migration. L'euthanasie des souris est faite par dislocation cervicale

suite à une injection intramusculaire d'une dose de 3 μ l de chlorhydrate de kétamine (Bioniche, Belleville, ON) par gramme de poids corporel (souris). Cette procédure est conforme au protocole éthique approuvé. Suite à l'euthanasie des souris, celles-ci sont disséquées afin de prélever les portions du tube digestif requises. Ces tissus extraits sont traités selon leur utilisation ultérieure, soit pour l'extraction des protéines et des ARNs épithéliaux, pour des essais de détection de la β -galactosidase ou soit pour en faire des coupes histologiques.

4. *Fixation des tissus et inclusion dans la paraffine*

Les tissus destinés à devenir des coupes histologiques pouvant servir en immunofluorescence, en hybridation *in situ* ou à diverses techniques de coloration sont placés à l'intérieur d'histosettes (Simport, Beloeil, QC) et sont fixés au paraformaldéhyde (PFA) (Sigma, St-Louis, MI) 4%, à 4°C, sur une période de 12 à 18 heures. Par la suite, les tissus sont lavés deux fois à l'éthanol 70% (VWR, West Chester, PA) puis conservés à 4°C dans un tampon PBS 1X (140 mM de NaCl (Fisher), 3 mM de KCl (Fisher), 8 mM de Na₂HPO₄ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), 1,5 mM de KH₂PO₄ (Fisher)) jusqu'à ce qu'ils soient circulés selon la méthode décrite au tableau 5. Les tissus sont ensuite inclus dans la paraffine sous forme de blocs au laboratoire de pathologie de l'Université de Sherbrooke. Finalement, des coupes histologiques sont faites à partir de ces blocs à l'aide d'un microtome (American Optical Co. Spencer-820).

Tableau 4. Préparation des tissus en vue de l'inclusion dans la paraffine

Étape	Substance	Durée et répétitions
1	Éthanol 70%	10 min, 6 fois
2	Éthanol 95%	10min, 3 fois
3	Éthanol 100%	10 min, 3 fois + 20 min, 3 fois
4	Toluène	1 heure, 1 fois + 12 à 18 heures, 1 fois
5	Paraffine 75°C	1 heure, 3 fois

5. *Dissociation et recouvrement des cellules épithéliales intestinales*

Les cellules épithéliales intestinales peuvent être dissociées du reste des tissus intestinaux puis récupérées selon une technique développée par la Dre Perreault en 1998 (PERREAULT & BEAULIEU, 1998). Cette technique de dissociation et de recouvrement des cellules épithéliales intestinales requiert l'utilisation de la solution Matrisperse™ (BD Biosciences, Franklin Falls, NJ). Suite à l'extraction des différentes portions du tube digestif, ce dernier doit être ouvert sur le sens de la longueur à l'aide de ciseaux chirurgicaux afin d'exposer la muqueuse intestinale à l'air ambiant. Par la suite, les tissus sont découpés en petits morceaux d'environ 0,5 cm puis déposés dans des tubes coniques de 15 ml contenant 4 ml de solution Matrisperse™ (1 tube par section de l'appareil digestif), à 4°C pour une période de 12 à 18 heures. Les tubes sont ensuite agités afin de dissocier les cellules épithéliales du reste des tissus. Le surnageant

contenant les cellules épithéliales est récolté puis centrifugé 3 minutes à 1000 rpm dans une nouvelle série de tubes coniques de 15 ml. Le surnageant est finalement jeté, puis les cellules épithéliales, sous forme de culot, subissent une extraction protéique ou une extraction d'ARN.

6. *Extraction d'ARN*

Les ARNs totaux peuvent être isolés à partir de cellules ou de tissus selon le protocole Totally RNA™ de la compagnie Ambion. Pour ce faire, les tissus homogénéisés ou les cellules sous forme de culot sont d'abord mélangés à 3 ml d'une solution de dénaturation (Ambion, Austin, TX) dans des tubes coniques de 15 ml. Ensuite, 3 ml de phénol : chloroforme : IAA (Ambion) est ajouté au mélange avant d'agiter le tout vigoureusement pendant une minute. La préparation est déposée sur glace pendant 15 minutes et est ensuite centrifugée à 10 000 rpm, 10 minutes à 4°C. La phase supérieure (aqueuse) alors présente dans les tubes est transférée dans une autre série de tubes coniques de 15 ml, puis on y ajoute 300 µl d'acétate de sodium (Ambion) avant d'agiter le tout par inversion. On ajoute ensuite à ce mélange 3 ml de phénol : chloroforme acide (Ambion) et on agite vigoureusement à nouveau pendant une minute. La préparation doit encore être laissée sur glace pendant 15 minutes puis centrifugée à 10 000 rpm, 10 minutes à 4°C. Encore une fois, c'est la phase supérieure (aqueuse) qui doit être récupérée dans une nouvelle série de tubes coniques de 15 ml et à laquelle on ajoute 500 µl d'isopropanol (Fisher) avant d'agiter par inversion puis incubé à

-20°C pendant 30 minutes. La préparation est par la suite centrifugée à 10 000 rpm, 20 minutes à 4°C et le surnageant issu de cette centrifugation est jeté. Les sels résiduels peuvent être éliminés du culot d'ARN en ajoutant 3 ml d'éthanol 70%, puis en agitant doucement 3 minutes. Ensuite, centrifuger 10 minutes à 13 500 rpm à 4°C et jeter le surnageant. Sécher finalement le culot avant de le resuspendre dans 50 µl d'eau DEPC 0.1% (Ambion). Les hydrates de carbonnes présents dans les extraits d'ARN peuvent aussi être éliminés par précipitation au LiCl (Ambion). Il faut ajouter 25 µl de solution de LiCl à l'extrait d'ARN, agiter doucement, puis incubé à -20°C pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé à 13 500 rpm, 15 minutes à 4°C et le surnageant est éliminé pour finalement resuspendre le culot dans 50 µl d'eau DEPC 0,1%. Une étape finale de traitement à la DNase est préférentiellement faite pour les extraits allant servir dans un contexte de RT-PCR. On doit alors ajouter aux extraits 6µl de tampon de DNase 10X (500 mM Tris-Hcl pH 7.5 (Fisher), 100 mM MgCl₂ (Fisher), 50 mM CaCl₂ (Fisher) et 500 µg/ml BSA (Sigma)) et 1 unité de DNase I (Roche). Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à 37°C, puis la DNase est inactivée en ajoutant 5 mM d'EDTA (Fisher) aux mélanges pour finalement incubé le tout à 75°C pendant 10 minutes. Les extraits d'ARN sont conservés à -80°C.

7. *Extraction protéique*

Pour extraire les protéines totales de cellules culottées ou de tissus homogénéisés, il faut d'abord y ajouter 1 ml d'un tampon de lyse (50 mM de Tris-HCl pH 7.5

(Fisher), 150 mM de NaCl (Fisher), 1% de NP-40 (Fluka Sigma), 0,5% p/v de sodium déoxycholate (Sigma)) auquel on a ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases dans une proportion de 1:100 (Sigma). Après avoir agité le tout, on procède à la sonication de chaque échantillon à une faible intensité pendant 10 secondes et en gardant les tubes sur glace. On centrifuge ensuite les extraits à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, puis on récupère finalement le surnageant (STEIN & al., 1989). Les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

8. RT-PCR

8.1 Réaction de transcription inverse (RT)

La réaction de transcription inverse vise à générer une banque d'ADN complémentaires (ADNc) à partir d'extraits d'ARN de tissus ou de cellules donnés. Pour ce faire, il faut d'abord dénaturer l'ARN présente dans une concentration de 0,1 µg/µl dans l'eau DEPC 0,1% (Ambion) à 75°C pendant 5 minutes. Ensuite, à 10 µl de cette solution d'ARN est ajouté 4 µl de tampon d'AMV reverse transcriptase 5X (Roche), 0,8 µl de dNTP 10 mM (Bio Rad), 2 µl de poly dT (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 1 µl d'inhibiteur de RNase (Roche) et 1,5 µl de AMV reverse transcriptase (Roche). Le volume réactionnel est alors complété à 20 µl avec de l'eau DEPC 0,1% (Ambion) puis incubé à 42°C pendant une heure. Finalement, la reverse transcriptase est

inactivée par une incubation à 95°C pendant 5 minutes (procédure mise au point par la compagnie Roche, Indianapolis, IN).

8.2 PCR : conditions et amorces utilisées

Une réaction d'amplification de séquences données est ensuite réalisée par PCR (appareil : Eppendorf Mastercycler EPgradient S, les mélanges réactionnels sont préparés tel que décrit à la page 33), à partir des banques d'ADNc (1 µl par mélange réactionnel) obtenues par RT, via l'utilisation de diverses paires d'amorces (dessinées à l'aide du logiciel Primer3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, et synthétisées chez IDT). Le tableau 6 contient les différentes conditions et paires d'amorces utilisées dans le cadre des expériences exécutées en RT-PCR.

Tableau 5. Liste des amorces et des conditions utilisées en RT-PCR

Amorces	Séquence	T° app.	Nbr cycles	Produits
BMP-2	5'-ctcagcgaatttgagttgagg-3'	64°C	30	562pb
	5'-cctgggttctcctctaaatgc-3'			
BMP-4	5'-tgtgtgtgtgtgtgtgtgtcc-3'	64°C	30	508pb
	5'-agaatcagccgatcgttacct-3'			
BMPR1a	5'-ccagaggataccttgcctttc-3'	64°C	30	440pb
	5'-tgcttcacctcgttccaaatc-3'			
BMPR1b	5'-actctgcctcctctcaaggac-3'	64°C	30	567pb
	5'-cgtctaagggtgggtgatttca-3'			
FoxF2	5'-agcagagctactgcaccaga-3'	64°C	30	152pb
	5'-ataagagccactagcgggaagg-3'			

9. Technique de détection de la β -galactosidase

La technique de détection de la β -galactosidase (WHITING & al., 1991) est utilisée, dans notre cas, afin de déterminer le patron d'expression ainsi que l'activité enzymatique de la recombinaise Cre chez la souris. Cette technique demande d'abord la dissection de souris villine-Cre; Gtrosa26^{tm1Sor} et Gtrosa26^{tm1Sor} selon la méthode décrite à la section 3. Les tissus recueillis doivent être lavés de tout le contenu du tube digestif (bol alimentaire, matières fécales) puisque la présence de matière en cours de digestion produit une coloration bleue non-spécifique, probablement à cause de la flore bactérienne. Ces tissus sont

ensuite pré-fixés pendant une heure dans la solution de fixation suivante : 1% formaldéhyde (37% stock, Fisher), 0,2% glutaraldéhyde (25% stock, Sigma), 2mM $MgCl_2$ (Fisher), 5mM EGTA (Fisher), 0,02% NP-40 (Fluka Sigma) puis compléter le volume avec un tampon PBS 1X. Suite à l'étape de pré-fixation, les tissus sont lavés trois fois dans un tampon PBS 1X pour être ensuite incubés dans la solution de détection de la β -galactosidase pendant environ six heures à 37°C. La solution de détection de la β -galactosidase est composée de la manière suivante : 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ (Sigma), 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ (Sigma), 2 mM $MgCl_2$ (Fisher), 0,01% sodium déoxycholate (Sigma), 0,02% NP-40 (Fluka Sigma), 1mg/ml X-gal (Fisher) (solution stock de 50 mg/ml dans du N-N-diméthylformamide (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ)), puis compléter le volume avec un tampon PBS 1X. Après l'étape de détection, les tissus sont lavés trois fois dans un tampon PBS 1X puis sont post-fixés dans du PFA 4% (Fisher) pour une période de 12 à 18 heures à 4°C. Les tissus ayant subi la technique de détection de la β -galactosidase sont finalement traités selon les étapes décrites à la section 4.

10. Immunofluorescence indirecte

Nous utilisons l'immunofluorescence indirecte (SUND & al., 2001; PERREAULT & al., 2001) afin de réaliser l'immunolocalisation de certaines molécules à l'intérieur d'une coupe histologique d'un tissu donné. Les tissus employés dans le cadre des essais en immunofluorescence indirecte sont d'abord

extraits, fixés et inclus dans la paraffine selon les méthodes décrites aux sections 3 et 4. Ainsi, les coupes histologiques sur lames de verre obtenues subissent un déparaffinage et une réhydratation. Pour se faire, les lames sont incubées à 60°C pendant 15 minutes, puis plongées dans des solutions de xylène 100% (EMD Chemicals) 2 fois 5 minutes, d'éthanol 100% 2 fois 2 minutes, d'éthanol 95% 2 fois 1 minute, d'éthanol 80% 1 fois 1 minute et d'éthanol 70% 1 fois 1 minute. Les lames sont ensuite immergées dans un bac d'eau stérile pendant une minute avant de les transférer dans 600 ml d'un tampon citrate de sodium 10 mM pH 6.0 (Fisher). Les lames dans le tampon citrate de sodium sont chauffées aux micro-ondes (Goldstar GMS-1124TW) à une intensité et une durée permettant au tampon de bouillir pendant 6 minutes. Par la suite, on laisse refroidir le tout pendant 10 minutes à la température de la pièce, puis on rince à l'eau courante à faible débit pendant un autre 10 minutes. Les lames sont dans un tampon PBS 1X, 2 fois 5 minutes, avant de procéder à la réaction de blocage des sites non-spécifiques. Cette étape consiste en l'incubation des tissus, recouverts d'une solution de BSA 2% (Sigma) (ou de sérum de lapin non immun 5% dans le cas des essais impliquant l'anticorps anti-chromogranine A) dans un tampon PBS 1X, pour une période de 20 minutes à la température de la pièce. À ce stade, les tissus sont prêts à être mis en contact avec l'anticorps primaire dilué dans le PBT (Pour 50 ml; 5 ml de PBS 10X, 50 mg de BSA (Sigma), 1 ml de Triton X-100 10% (Fisher) puis compléter le volume à 50 ml avec de l'eau stérile). La dilution de l'anticorps primaire varie pour chaque anticorps. Une liste détaillée de tous les anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte ainsi que les

différents détails d'utilisation sont donnés dans le tableau 7. Un volume de 200 µl de dilution d'anticorps primaire est alors déposé sur les tissus, puis une incubation de 12 à 18 heures à 4°C s'ensuit dans une chambre humide. Les lames sont ensuite lavées avec du PBS 1X 2 fois 5 minutes, puis 200 µl d'une dilution d'anticorps secondaire couplé à un fluorophore est déposée sur chaque tissu pour une incubation de 2 heures à la température de la pièce dans une chambre humide. À partir de cette étape, il est impératif de protéger les lames et l'anticorps secondaire de la lumière jusqu'à la fin de l'expérience (dilutions et détails d'utilisation des anticorps secondaires; voir tableau 8). Les lames sont par la suite lavées avec du PBS 1X 3 fois 10 minutes sous agitation avant d'être séchées dans une chambre sèche à l'abri de la lumière. Finalement du milieu de montage Vectashield™ (Vector, Burlingame, CA), avec ou sans colorant DAPI (selon l'expérience) est déposé sur les tissus (environ une goutte) en compagnie de lamelles à microscopie (Selected micro Cover Glasses 1 ounce 24 x 60 mm, VWR, West Chester, PA).

Tableau 6. Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Dilution	Source	Fournisseur
Anti-BMPRIa # sc-5676	1 : 500	Chèvre	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Anti-Phospho-Smad-1, 5 et 8 # 9511	1 : 100	Lapin	Cell Signaling Technology, Beverley, CA
Anti-BrdU # 1 170 376	1 : 200	Souris	Roche Diagnostics, Indianapolis, IN
Anti-E-cadhérine # C20820	1 : 1000	Souris	Transduction Labs, BD Biosciences, San Jose, CA
Phosphatase alcaline # RDI-ALKPHOSabr	1 : 250	Lapin	Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ
IFABP	1 : 1000	Lapin	Don du Dr Gordon
Lysozyme # N1515	1 : 2	Lapin	DakoCytomation, Glostrup, Danmark
Chromogranine A # 08-4094	Pré-dilué	Lapin	Zymed Invitrogen
Klf-4	1 : 1000	Lapin	Don du Dr Katz

Tableau 7. Liste des anticorps secondaire utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Dilution	Fluorophore	Fournisseur
Anti-chèvre # FI-5000	1 : 200	FITC	Vector
Anti-lapin # FI-1000	1 : 200	FITC	Vector
Anti-souris # FI-2000	1 : 200	FITC	Vector

11. Coloration hématoxyline et éosine (H & E)

La technique de coloration par l'hématoxyline et l'éosine permet de mettre en évidence les différentes structures morphologiques retrouvées à l'intérieur d'un tissu donné. L'hématoxyline colore les structures basophiles telles que les noyaux (acides nucléiques) tandis que l'éosine est responsable de la coloration des structures acidophiles. Pour la réalisation de cette technique, nous devons d'abord procéder au déparaffinage et à la réhydratation des coupes histologiques tel que décrit au cours de la section 10. Ensuite, on dépose les lames dans l'hématoxyline (EMD Chemicals) pendant 5 secondes environ, puis on procède au lavage de celles-ci avec de l'eau pendant 3 minutes. Le lavage des lames se poursuit ensuite avec de l'eau courante à faible débit pendant 1 minute. Par la suite, les échantillons tissulaires sont déposés dans un bac contenant de l'éosine (Éosine Y

0,25% p/v (Fluka Sigma), acide acétique glacial 0,5% v/v (Fisher) dans l'éthanol 70%) pendant 3 secondes puis s'amorce finalement la déshydratation des coupes à raison de 2 fois 30 secondes dans l'éthanol 95%, 2 fois 30 secondes dans l'éthanol 100% et 2 fois 30 secondes dans le xylène pur. Les lames sont montées avec du Geltol™ (Thermo, Pittsburgh, PA) et des lamelles à microscopie (VWR).

12. Immunobuvardage

Les extraits protéiques sont d'abord quantifiés selon la méthode de Bradford qui consiste en la lecture de la densité optique à 595 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (SmartSpec™ Plus, Bio Rad), d'une solution de 1 ml de réactif de Bradford (Bio Rad) 20% à laquelle on ajoute 1 µl d'extrait protéique. La valeur de densité optique obtenue nous permet ensuite de calculer la concentration protéique de l'extrait en µg/µl. Les échantillons protéiques sont migrés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA) pendant environ 1h30 à 200 V. Des échantillons contenant 50 µg de protéines dans un tampon de chargement (par échantillon; 6,25 µl de NuPAGE LDS sample buffer 4X, 2,5 µl de NuPAGE sample reducing agent (DTT) 10X et compléter le volume à 25 µl avec de l'eau stérile) sont déposés dans les puits du gel d'électrophorèse. Le processus de migration à l'intérieur de ce gel se fait dans un tampon MES (acide 2-(4-morpholino)-ethane sulphonique, NuPAGE, Invitrogen) auquel on ajoute du NuPAGE antioxydant (Invitrogen) dans une proportion de 0,05%. Suite à la

migration des échantillons sur gel de polyacrylamide, on procède au transfert des protéines à l'intérieur de ce gel sur une membrane de PVDF (Roche). Pour se faire, un montage en sandwich comprenant le gel de polyacrylamide et la membrane entre des papiers Whatman est placé à l'intérieur d'une chambre à transfert contenant un tampon de transfert (bicine 0,4% (Fisher), bis-Tris 0,5% (Fisher), EDTA 0,03% (Fisher), NuPAGE antioxydant 0,2% (Invitrogen) et méthanol 5% (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) si la protéine d'intérêt est plus petite que 100 KDa). Un courant de 30V est ensuite appliqué sur le montage pendant 75 minutes à la température de la pièce. La membrane est ensuite incubée pendant 2 heures dans une solution de PBS 1X, 0,1% Tween 20 (Fisher), 5% lait en poudre sans gras (Carnation, Nestle, North York, ON) à la température de la pièce. Par la suite, on procède à la détection des antigènes en commençant par incuber la membrane en présence d'un anticorps primaire, dirigé contre notre protéine d'intérêt, dilué dans cette même solution de PBS 1x/Tween 20 0,1%/lait en poudre 5% pour une durée et à une température variable selon les conditions d'utilisation de chaque anticorps (voir tableau 9). Après cette incubation, la membrane est lavée 5 fois 10 minutes sous agitation (Agitateur élliptique FINE PCR SH30) dans du PBS 1X, Tween 20 0,1% avant d'être mis en contact avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort, dilué 1 : 3000 dans la solution PBS/Tween/lait en poudre, pendant 1 heure à la température de la pièce (voir tableau 10). Ensuite, la membrane est à nouveau lavée 5 fois 10 minutes avec du PBS 1X, Tween 20 0,1% puis l'activité enzymatique de la peroxydase de raifort, présente au niveau de l'anticorps secondaire, est détectée à l'aide d'une

solution ECL Plus Western Blotting Detection System™ (Amersham Biosciences) qui est déposée sur la membrane pendant 5 minutes. La membrane est finalement enveloppée dans une pellicule de plastique puis exposée sur un film photographique Hyperfilm™ (Amersham Biosciences) pour une période de temps variable selon l'expérience (procédure expérimentale selon PERREAULT & al., 2001; KATZ & al., 2004).

Tableau 8. Liste des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage

Anticorps	Dilution	T° d'incubation	Source	Fournisseur
Anti-c-Myc # sc-764	1 : 200	4°C	Lapin	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Cycline D2	1 : 1000	4°C	Lapin	Don du Dr Rivard
Anti-MMP-7 active # IM47L	1 : 250	T° pièce	Souris	Oncogene Calbiochem, San Diego, CA
Anti-E-cadhérine C20820	1 : 5000	4°C	Souris	Transduction Labs, BD Biosciences
Anti-APOBEC-1 # sc-11735	1 : 250	T° pièce	Chèvre	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Klf-4	1 : 1000	4°C	Lapin	Don du Dr Katz
Anti-Actine # Sc-1615	1 : 5000	4°C	Chèvre	Santa Cruz Biotechnology

Tableau 9. Liste des anticorps secondaires utilisés en immunobuvardage

Anticorps	Dilution	T° d'incubation	Fournisseur
Anti-chèvre # sc-2056	1 : 3000	T° pièce	Santa Cruz Biotechnology
Anti-lapin # sc-2077	1 : 3000	T° pièce	Santa Cruz Biotechnology
Anti-souris # sc-2096	1 : 3000	T° pièce	Santa Cruz Biotechnology

13. Analyse par PCR quantitatif

Le PCR quantitatif en temps réel est un outil permettant d'établir des comparaisons quantitatives entre les niveaux d'expression du messenger d'un gène d'intérêt à l'intérieur de différentes populations. La méthode est basée sur la détection de la variation de l'intensité de fluorescence générée par l'incorporation d'un composé chimique (SYBR green™) à l'intérieur de l'ADN double brin produit au cours d'une réaction d'amplification par PCR. Les essais en PCR quantitatif sont réalisés à partir de banques d'ADNc des différentes populations, au sein desquelles la comparaison des niveaux d'expression du messenger d'un gène d'intérêt doit être faite. Ces banques d'ADNc, qui proviennent dans notre cas, de jéjunum total de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 220 jours, doivent être exemptes de toute contamination par de l'ADN génomique

(vérification par PCR, en utilisant une paire d'amorces dont la séquence s'hybride avec une portion intronique d'un gène donné; HoxC6 dans notre cas). Par la suite, la température d'appariement optimale pour chacune des paires d'amorces utilisées est déterminée par PCR en gradient de température. Des dilutions sérieées d'une des banques d'ADNc (habituellement d'une souris contrôle) sont ensuite faites, afin de déterminer l'efficacité d'amplification de la réaction de PCR en temps réel. Cette banque d'ADNc est appelée «calibreur» et servira à générer la courbe standard en vue des expériences quantitatives. Les présentes expériences en PCR quantitatif en temps réel ont été menées en utilisant la trousse Quantitect SYBR green PCR Kit™, selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Mississauga, ON) et pour l'utilisation de l'appareil Light Cycler II® (Roche). La mise en graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification donne lieu à une courbe de croissance sigmoïdale. À l'intérieur de cette courbe sigmoïdale, on retrouve une portion représentant une phase exponentielle où l'intensité de fluorescence émise par le SYBR green dépend directement de la quantité d'ADN double brin retrouvé dans le tube réactionnel. Un point d'intersection est déterminé à partir de cette région de la courbe par le logiciel «Roche Light Cycler Software® version 4.0». Ensuite, un graphique des différents points d'intersection obtenus en fonction du logarithme des différentes concentrations d'ADNc calibreur nous donne une courbe dont la pente équivaut à la valeur de l'efficacité de la réaction. Cette valeur doit être idéalement de $2 \pm 0,1$ et représente la synthèse d'une copie complète du segment d'ADN d'intérêt par brin matrice disponible à chaque cycle d'amplification. Par la suite, 5 dilutions

sériées de l'ADNc calibre sont faites selon des concentrations se retrouvant dans une portion de la courbe dont la pente se rapproche le plus de la valeur «2». Par la suite, une courbe standard est faite, à partir de ces dilutions d'ADNc calibre (triplicata), pour chaque gène étudié. La courbe standard permet de minimiser les variations inter-expériences, en fournissant un point de calibration, lorsqu'un échantillon ayant servi à la création de cette courbe est réutilisé dans une autre expérience. Afin de quantifier efficacement l'expression d'un gène d'intérêt, l'expression d'un gène de référence est aussi quantifiée en utilisant les mêmes banques d'ADNc. Les gènes de références utilisés doivent répondre aux deux critères suivants : 1) présenter des niveaux d'expression similaires à ceux du gène d'intérêt. 2) leurs niveaux d'expression ne doivent pas être influencés par la variation de l'expression du gène étudié. Lorsque les gènes de références ont été choisis et que les courbes de calibration ont été faites, on peut procéder à l'expérience quantitative en utilisant des dilution sériées, présentes dans notre courbe standard, afin de quantifier l'expression du gène d'intérêt en plus du gène de référence dans les échantillons contrôles et expérimentaux. Finalement, les valeurs obtenues pour le gène de référence et le gène d'intérêt sont combinées afin d'obtenir un ratio permettant la comparaison entre les individus à l'aide de valeurs numériques transposées sous forme d'histogramme. Le tableau 11 représente les caractéristiques des différentes amorces (dessinées à l'aide du logiciel Primer3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, et synthétisées chez IDT) utilisées pour les essais de PCR quantitatif en plus des gènes de références utilisés au cours de chaque essai.

Tableau 10. Amorces et gènes de références utilisés en PCR quantitatif

Gènes d'intérêt	Amorces	T° app.	Produit	Gène de référence
Sucrase-isomaltase	5'-ggcaaagaagaaattcagtg-3'	58°C	311 pb	TBP
	5'-tcatagccatgggtgtctgc-3'			
Klf-4	5'-cagtatacattccgccacagc-3'	59°C	139 pb	Hmbs
	5'-gtctgggcttcttctgtaac-3'			
Msx1	5'-cagaagatgctctggtgaagg-3'	59°C	136 pb	TBP
	5'-gttggtcttgcttgctgtag-3'			
TBP	5'-agcctccaccttatgtca-3'	59°C	250 pb	-
	5'-tgtgtgggttgctgagatgt-3'			
Hmbs	5'-tgcacgatcctgaaactctg-3'	59°C	162 pb	-
	5'-tgcattgctatctgagccatc-3'			
HoxC6	5'-gagaatgtcgttcagttccagc-3'	59°C	287 pb	-
	5'-aagtgaattccttctccagttcc-3'			

14. Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ*, qui a été mise au point dans le laboratoire du Dr Kaestner (LANTZ & al., 2004), permet la localisation d'ARN messagers particuliers au niveau d'une coupe tissulaire via l'utilisation d'une ribo-sonde spécifique aux messagers en question. En effet, cette ribo-sonde doit posséder une séquence lui permettant son hybridation avec les messagers d'intérêt. La sonde utilisée dans le cadre de nos expériences portant sur la sucrase-isomaltase provient du laboratoire du Dr Boudreau (BOUDREAU & al., 2002), et a été

marquée et purifiée au laboratoire par Benoit Auclair. Cette sonde, dont la séquence a été clonée à l'intérieur d'un vecteur plasmidique d'expression, est transcrite sous forme d'ARN via l'utilisation de nucléotides marqués à la dioxygénine (DIG) (Roche). Les coupes histologiques utilisées pour l'expérience doivent d'abord être déparaffinées et réhydratées selon la manière décrite à la section 10. Toutefois, il est important de noter que, puisque nous travaillons avec de l'ARN, il faut utiliser des solutions faites avec DEPC (Sigma) et des appareils exempts de toutes RNases. Suite aux traitements des lames par le xylène et les différentes concentrations d'éthanol, ces coupes histologiques sont lavées dans l'eau 0,1% DEPC puis fixées dans du PFA 4% DEPC 0,1% pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les lames sont par la suite lavées 3 fois 3 minutes avec du PBS 1X commercial (Invitrogen) puis traitées avec une solution de protéinase K (pour 50 ml; 2,5 ml Tris-HCl 1 M pH 7.5 0,1% DEPC, 500 µl EDTA 0,5 M 0,1% DEPC et 100 µl de protéinase K 10mg/ml (Roche)) pendant 4 minutes à la température de la pièce. Ensuite, on post-fixe les tissus dans du PFA 4% 0,1% DEPC pendant 5 minutes à la température de la pièce puis on lave le tout avec du PBS 1X DEPC 0,1% 5 minutes. Après cette étape, les tissus sont incubés dans la solution TEA (pour 50 ml; 0,925 g de triéthanolamine (Sigma), 112 µl de NaOH 10 N (Fisher), 62,5 µl d'anhydride acétique (Fisher) puis compléter le volume à 50 ml avec de l'eau DEPC 0,1%) pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les lames sont lavées avec du PBS 1X DEPC 0,1% 3 fois 5 minutes puis les échantillons sont déposés dans une boîte hermétique contenant des papiers absorbants imbibés de solution de saturation (pour 50ml;

12.5 ml de SSC 20X pH 7.0 (Mediatech, Herndon, VA), 25 ml de formamide 100% (Fisher) et compléter le volume à 50 ml avec de l'eau DEPC 0,1%). Ensuite, sur chaque lame, on ajoute environ 200 µl de solution de préhybridation (pour 10 ml; 5 ml de formamide 100% (Fisher), 2,5 ml de SSC 20X pH 7.0, 1 ml de solution de Denhardt 50X (Fisher), 250 µl d'ARNt de levures 10mg/ml (Roche), 500 µl de sperme de hareng 10 mg/ml (Sigma) et 750 µl d'eau DEPC 0,1%) et le tout est incubé pendant 2 à 6 heures à la température de la pièce. Suite à la préhybridation, on ajoute sur chaque tissu 200 µl de ribo-sonde dans une concentration de 300 ng/ml dans la solution de préhybridation, puis on couvre le tout avec une bande de Parafilm™ (Parafilm, Menasha, WI). La boîte hermétique est ensuite refermée, puis incubée à 68°C pendant 12 à 18 heures. Après avoir enlevé le parafilm, les lames sont déposées dans une solution SSC 0,2X, à 55°C pendant 1 heure avant de les laver 5 minutes avec la solution SSC 0,2X puis 5 minutes avec du tampon B1 (pour 250 ml; 2,9 g d'acide maléique (Fisher), 2,175 g de NaCl (Fisher), 225 ml d'eau stérile, ajuster le pH à 7.5 avec du NaOH 10 N (Fisher) puis compléter le volume à 250 ml avec de l'eau stérile). Les échantillons sont ensuite incubés en présence de la solution de blocage 1% (pour 100 ml; 100 mg de «Blocking Powder» (Roche) dans 5 ml de tampon B1) pendant 1 heure à la température de la pièce. La solution de blocage est ensuite jetée et on dépose alors sur les tissus 200 µl d'anticorps anti-dioxygénine (Roche Diagnostics) dilué 1 : 1500 dans le tampon B1 et on laisse incuber 3 heures à la température de la pièce dans une chambre humide. Par la suite, on rince les lames 2 fois 30 minutes dans le tampon B1, puis on dépose 200 µl de tampon

B3/levamisole (Tris-HCl 2 M pH 9.5 (Fisher), NaCl 5 M (Fisher), MgCl₂ 1 M (Fisher) et 0,240 g/L de levamisole (Sigma)) contenant 17,5 µl de NBT (Roche) et 17,5 µl de BCIP (Roche) sur chaque lame pour ensuite incuber à la température de la pièce pendant 12 à 18 heures dans une chambre humide. La réaction de coloration est arrêtée en lavant les lames dans du PBS 1X 2 fois 5 minutes. Finalement, les lames sont montées avec du Geltol™ (Thermo) et des lamelles à microscopie (VWR).

15. Mise en évidence des mucines sulfatées par coloration au bleu d'Alcian

La technique de coloration au bleu d'Alcian permet le marquage des mucines sulfatées présentes à l'intérieur des cellules caliciformes de l'épithélium intestinal. Ainsi, cette méthode nous permet de faire la mise en évidence de ce type cellulaire au niveau de coupes histologiques d'intestin de souris. Pour se faire, les coupes histologiques sur lames de verre doivent être déparaffinées et réhydratées selon les étapes décrites à la section 10. Ensuite, les lames sont incubées dans une solution d'acide acétique glacial 3% (Fisher) pendant trois minutes. Pour l'étape de coloration, on dépose sur les lames une solution de bleu d'Alcian 1%, 3% acide acétique pH 2.5 (Poly Scientific, Bay Shore, NY) et on laisse réagir pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les lames sont par la suite lavées à l'eau courante (faible débit) pendant 10 minutes avant de recevoir une contre-coloration par le Nuclear Fast Red Kernechtrot 0,1% (Poly Scientific, Bay Shore, NY), préalablement filtré, pendant 40 secondes. Finalement, les échantillons sont lavés

pendant une minute à l'eau courante (faible débit), déshydratés à raison de 2 fois 1 minute dans l'éthanol 95%, 2 fois 2 minutes dans l'éthanol 100% puis 2 fois 5 minutes dans le xylène pur avant d'être montés avec du Geltol™ (Thermo) et des lamelles à microscopie (VWR).

16. Microscopie électronique à transmission

Les tissus sont d'abord extraits des souris selon la méthode décrite à la section 3, avant d'être déposés dans un tampon de fixation de glutaraldéhyde 2,5% (Cedarlane, Hornby, ON) et cacodylate 0,1 M à pH 7.4 (Cedarlane) pendant 24 heures à la température de la pièce. Les tissus sont ensuite lavés avec du tampon cacodylate 0,1 M 2 fois 5 minutes puis fixés à nouveau avec une solution d'acide osmique 2% (Cedarlane) pendant 90 minutes à la température de la pièce. Les échantillons sont à nouveau lavés 2 fois 5 minutes avec du tampon cacodylate 0,1 M, puis sont déshydratés par des incubations successives de 5 minutes dans des solutions d'éthanol 50%, 70%, 85%, 95% et 100%. La dernière incubation (éthanol 100%) est répétée trois fois. Des lavages à l'oxyde de propylène (Cedarlane) sont ensuite effectués sur les tissus, à raison de 3 fois 5 minutes, puis ceux-ci sont par la suite incubés dans une solution 50% oxyde de propylène (Cedarlane) et 50% EMbed-812™ (Cedarlane) pendant 90 minutes à la température de la pièce. Les tissus sont par la suite incubés dans la solution EMbed-812™ (Cedarlane) 100%, 2 fois 1 heure, puis une troisième incubation qui s'étend sur 18 heures. Les tissus sont ensuite inclus dans la solution EMbed-

812TM via une incubation de 48 heures à 60°C. Des coupes histologiques de 75 Å des tissus préalablement inclus ont été faites à l'aide d'un microtome. Les tissus sont déposés sur une grille métallique de 300 Mesh (Cedarlane) pour finalement être incubés dans une solution de citrate de plomb et d'acétate d'uranyl 2% (Cedarlane) pendant 10 minutes. Les échantillons sont à ce moment prêts à être analysés au microscope électronique (Hitachi, modèle H-7500).

17. Analyse des résultats et statistiques

Concernant la visualisation de l'efficacité de recombinaison chez les souris villine-*Cre*; Gtrosa26^{tm1Sor} (Figure 5-B et C), les résultats obtenus sont représentatifs de 2 expériences indépendantes totalisant quatre souris de chaque groupes (n=4). En ce qui concerne la détermination du patron d'expression du messager de différents facteurs et récepteurs de la voie BMP au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 6), les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences indépendantes impliquant au total trois souris de type sauvage (n=3).

Pour le reste de cette section « analyse des résultats et statistiques », les souris utilisés sont classées à l'intérieur des groupes contrôle et expérimental, comprenant des souris de type sauvages et des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} respectivement. Les résultats obtenus pour l'immunolocalisation du récepteur BMPRIa (Figure 7) sont représentatifs de deux expériences indépendantes impliquant une souris dans chaque groupe (n=1). Pour ce qui est

de l'immunolocalisation des protéines Smads 1, 5 et 8 phosphorylées, de la E-cadhérine, de la phosphatase alcaline, du facteur IFABP, du lysozyme et du facteur Klf-4 (Figures 8, 12-A, 14, 15-A et B, 17 et 19-A et B), les résultats obtenus sont représentatifs de deux expériences indépendantes impliquant deux souris par groupe (n=2). Les résultats obtenus lors des analyses morphologiques de la muqueuse intestinale par des colorations hématoxyline et éosine (Figure 9) sont représentatifs de trois expériences indépendantes impliquant au total six souris dans chaque groupe (n=6). Pour ce qui est de l'étude de la prolifération et de la migration cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 10), les résultats que nous avons obtenus sont représentatifs de trois expériences indépendantes impliquant au total six souris par groupe (n=6). Tous les résultats d'analyses en immunobuvardage relatives aux protéines c-Myc, cycline D2, MMP-7, E-cadhérine, APOBEC-1 et Klf-4 (Figures 11, 12-B, 15-C et 19-C) sont représentatifs de deux expériences indépendantes impliquant au total deux souris par groupe (n=2). Les résultats obtenus par hybridation *in situ* dans le cadre de la localisation du messenger de la sucrase-isomaltase (Figure 13-A et B) sont représentatifs d'une seule expérience impliquant deux souris par groupe (n=2). Les observations relatives aux cellules caliciformes de l'épithélium intestinal, soit en microscopie électronique à balayage ou par une coloration au bleu d'Alcian (Figure 16-A, B, C et D), sont représentatives de trois expériences indépendantes impliquant au total deux souris par groupe (n=2). Dans le cas de la mise en évidence des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal (Figure 18-A et

B), les observations faites sont représentatives de trois expériences indépendantes impliquant quatre souris par groupe au total (n=4).

Les résultats obtenus en PCR quantitatif portant sur les niveaux d'expression des messagers de la sucrase-isomaltase, du facteur *Msx1* et du facteur *Klf-4* (Figures 13-C, 18-D et 19-D) sont représentatifs de deux expériences indépendantes impliquant une seule souris du groupe contrôle et deux souris du groupe expérimental. Les barres d'erreur apparaissant au niveau des graphiques des figures 13-C, 18-D et 19-D correspondent aux écarts types sur la moyenne des ratios de l'intensité de fluorescence détectée pour le gène d'intérêt par rapport à l'intensité de fluorescence du gène de référence. Les comptes statistiques effectués sur les populations de cellules entéroendocrines et caliciformes retrouvées chez les souris du groupe contrôle et celles du groupe expérimental ont été par trois compteurs différents et les résultats obtenus ont été soumis à un test de Student (SCHERRER, 1984). Pour les études de recensement des cellules caliciformes par axe crypte-villosité, l'échantillonnage correspond à 21 comptes par groupe de souris, pour une valeur de «t» de -1,062 avec 20 degrés de liberté et un seuil de signification de $p < 0,05$. En ce qui concerne les études portant sur le nombre de cellules entéroendocrines par axe crypte-villosité, l'échantillonnage correspond à 56 comptes par groupe de souris, pour une valeur de «t» de 4,973 avec 55 degrés de liberté et un seuil de signification de $p < 0,05$.

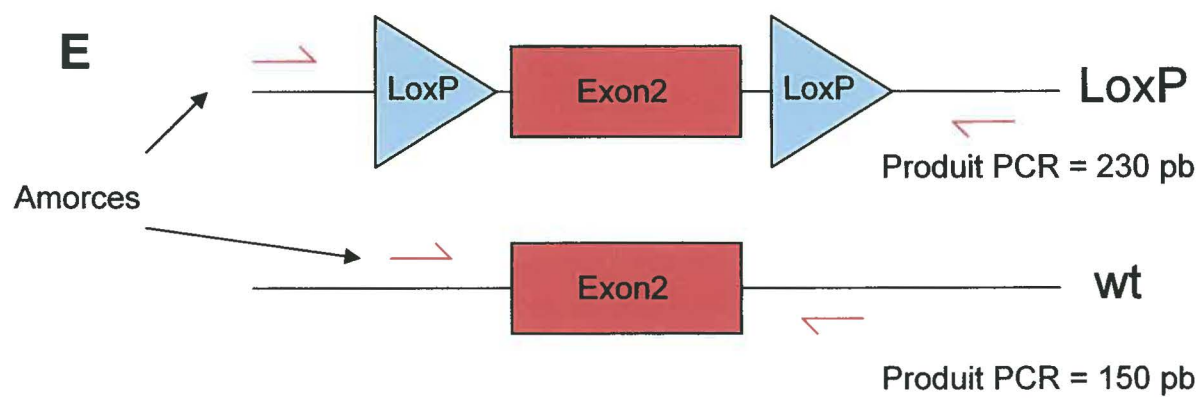
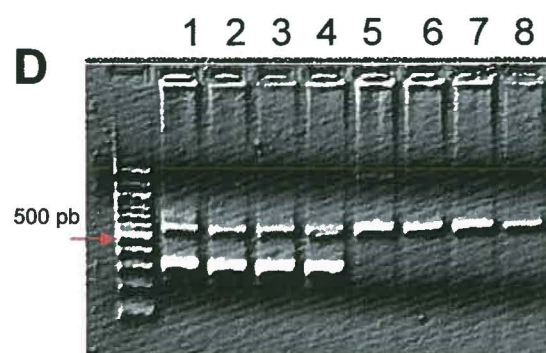
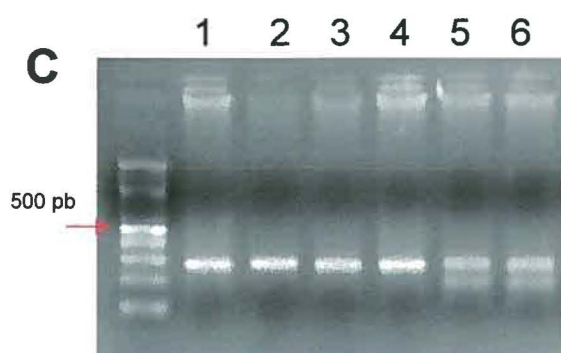
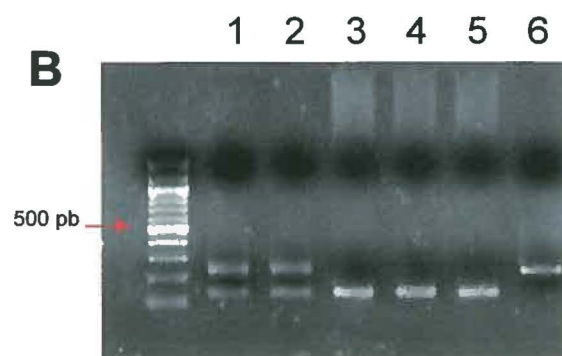
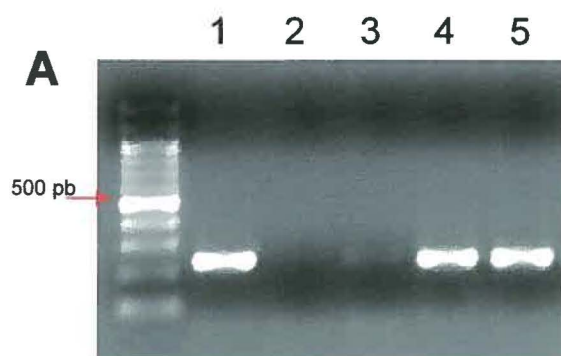
III – Résultats

1. Détermination du génotype des souris

Suite aux croisements entre nos différentes lignées de souris, nous devons déterminer le génotype des générations issues de celles-ci. Pour se faire, nous effectuons d'abord des extractions d'ADN génomique à partir d'un échantillon de tissus prélevé sur les souris en bas âges. Par la suite, nous utilisons des amorces oligonucléotidiques afin d'amplifier par PCR certaines séquences du génome des souris. Par cette méthode, il nous est possible, par exemple, de déterminer si le gène codant pour la recombinaise Cre est bel et bien présent au niveau du génome d'une souris (Figure 4-A, pistes 1, 4 et 5). Le génotypage par PCR nous permet d'identifier les souris possédant des séquences LoxP au niveau du gène *BMPRIa*, soit *BMPRIa*^{Fx/+} et *BMPRIa*^{Fx/Fx} ou le terme « Fx » signifie que le segment d'ADN en question est flanqué de deux séquences LoxP orientées dans le même sens au niveau d'une allèle (Figure 4-B). Nous avons aussi généré des souris qui démontrent une délétion classique de *BMPRIa* sur une seule allèle (*BMPRIa*-S) tandis que l'autre comporte des séquences LoxP de même orientation de part et d'autre de l'exon 2 (Figure 4-C). De plus, nous utilisons le génotypage par PCR afin d'identifier les souris ayant hérité du gène rapporteur *LacZ* au niveau des croisements impliquant la lignée Gtosa26^{tm1Sor} (Figure 4-D).

Figure 4. Détermination du génotype des différentes lignées de souris

Le génotype des souris est déterminé à l'aide de diverses paires d'amorces oligonucléotidiques permettant d'amplifier par PCR, sur des échantillons d'ADN génomique, certaines particularités du génome des différentes lignées de souris utilisées. **A)** L'utilisation des amorces « Cre » nous permet de déterminer si une souris possède ou non le gène codant pour la recombinaise Cre sous l'influence du promoteur de la villine via l'obtention d'un produit PCR de 230 pb. Les pistes 1, 4 et 5 correspondent à un résultat positif tandis que les pistes 2 et 3 représentent des cas négatifs. **B)** La même stratégie a été utilisée pour distinguer le génotype des souris dont le gène *BMPRIa* est flanqué de séquences loxP. Pistes 1 et 2 : *BMPRIa*^{LoxP/+}, fragments PCR de 230 pb et 150 pb. Pistes 3, 4, et 5 : *BMPRIa*^{+/+}, fragment PCR de 150 pb. Piste 6 : *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}, fragment PCR de 230 pb. **C)** Dans le cas des souris dont le gène *BMPRIa* est délété sur un seul allèle (*BMPRIa*-S), on obtient des produits PCR de 280 pb et 190 pb (pistes 5 et 6). Les souris ne démontrant pas cette délétion présentent un fragment PCR de 280 pb (pistes 1, 2, 3 et 4). **D)** La présence du gène rapporteur *LacZ* chez les souris *Gtrosa26*^{tm1Sor} est déterminée par l'obtention d'un fragment PCR de 300 pb comme le démontrent les pistes 1 à 4 (*Gtrosa26*^{tm1Sor LacZ/+}). Le fragment à 550 pb représente un allèle dépourvu du gène rapporteur *LacZ*. **E)** Schéma représentant le génotypage d'un allèle *BMPRIa*-LoxP par rapport à un allèle de type sauvage.



2. La recombinaise Cre dans notre modèle expérimental

À l'intérieur de notre modèle de souris expérimentales, l'expression de la recombinaise Cre est régie par le promoteur de la villine. Ce promoteur est actif uniquement au niveau de l'épithélium intestinal et doit donc diriger l'expression de la recombinaise Cre spécifiquement à cet endroit. Afin de vérifier l'efficacité de notre système d'expression de la recombinaise Cre, c'est-à-dire la localisation adéquate de l'enzyme et la capacité de celle-ci à reconnaître et recombiner les séquences LoxP, nous avons utilisé la lignée de souris Gtrosa26^{tm1Sor} obtenue de la compagnie Jackson Laboratories. Cette lignée possède dans son génome le gène rapporteur *LacZ*, codant pour l'enzyme β -galactosidase, dont l'expression est prévenue par la présence d'un codon d'arrêt de la polymérase en amont du codon d'initiation de la traduction. Ce codon d'arrêt est flanqué de deux séquences LoxP orientées dans le même sens, permettant ainsi l'excision de ce codon en présence de la recombinaise Cre. Donc, en aucun temps il ne pourra y avoir de production de β -galactosidase au niveau de ces souris, sauf s'il y a présence de la recombinaise Cre. En ce qui nous concerne, nous avons croisé nos souris villine-Cre avec ces souris Gtrosa26^{tm1Sor} afin d'obtenir un génotype villine-Cre; Gtrosa26^{tm1Sor} (Figure 5-A). Ce croisement permet l'obtention de souris potentiellement capable d'exprimer la recombinaise Cre et ayant le gène rapporteur *lacZ* dans leur génome. Nous pourrions ainsi déterminer, par un suivi de l'expression de la β -galactosidase via l'utilisation du substrat synthétique X-gal, si notre recombinaise Cre est belle et bien exprimée spécifiquement au niveau de

l'épithélium intestinal et si elle peut efficacement reconnaître et recombinaison les séquences LoxP.

2.1 Expression de la recombinaison Cre au niveau du tube digestif

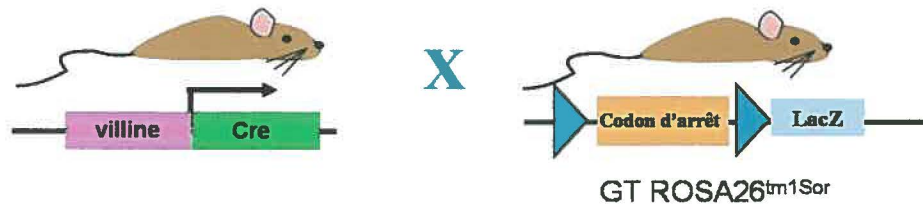
Nous avons extrait le tube digestif, comprenant l'estomac, l'intestin grêle et le colon, de souris villine-*Cre*; *Gtrosa26*^{tm1Sor} adultes (groupe expérimental) et de souris *Gtrosa26*^{tm1Sor} du même stade (groupe contrôle) afin de les soumettre à la technique de détection de la β -galactosidase. Les tubes digestifs ont préalablement été lavés dans un tampon PBS, puisque le bol alimentaire et les fèces produisent une coloration bleue non-spécifique se confondant avec la coloration du tissu lui-même. Chez les souris du groupe contrôle, aucune coloration du tube digestif n'a été observée à l'exception de la portion proximale du colon, où l'on note la présence d'une coloration non-spécifique due au contact entre le X-gal et la microflore intestinale présente dans les résidus de matières fécales (Figure-5-B, panneau 1). Par contre, le tube digestif des souris du groupe expérimental présente une forte coloration bleue au niveau de l'intestin grêle, une coloration plus faible au niveau du colon comparativement à l'intestin grêle et une absence de coloration au niveau de l'estomac (Figure 5-B, panneau 2). Ces observations démontrent que la recombinaison Cre est fortement exprimée au niveau de l'intestin grêle des souris villine-*Cre*; *Gtrosa26*^{tm1Sor} et que l'enzyme peut efficacement reconnaître et recombinaison les séquences LoxP.

Figure 5. Visualisation de l'efficacité de recombinaison chez les souris

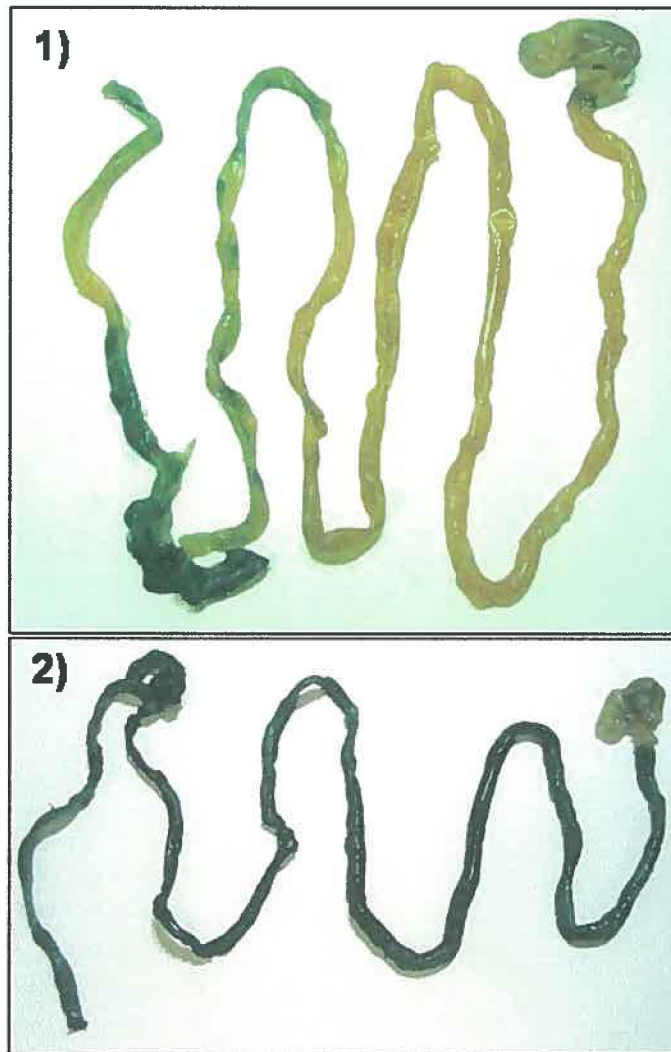
villine-Cre; Gtrosa26^{tm1Sor}

A) Le croisement entre les lignées villine-*Cre* et Gtrosa26^{tm1Sor} nous permet d'obtenir des souris villine-*Cre*; Gtrosa26^{tm1Sor} *LacZ*^{+/+}, à l'intérieur desquelles il sera possible de suivre d'expression de la recombinaison Cre via l'expression du gène rapporteur *LacZ*. B) Vue d'ensemble d'une portion du tube digestif. L'image 1) représente l'estomac, l'intestin grêle et le colon d'une souris Gtrosa26^{tm1Sor} *LacZ*^{+/+}, tandis que l'image 2) représente les mêmes segments de l'appareil digestif chez une souris villine-*Cre*; Gtrosa26^{tm1Sor} *LacZ*^{+/+}. C) À la figure 1) on remarque l'absence d'expression du gène *LacZ* au niveau de l'épithélium intestinal des souris Gtrosa26^{tm1Sor} *LacZ*^{+/+} (Grossissement 200x). 2) L'Expression de la recombinaison Cre est spécifique à l'épithélium intestinal chez les souris villine-*Cre*; Gtrosa26^{tm1Sor} *LacZ*^{+/+} (Grossissement 200x) et confirmation de la capacité de cette enzyme à recombinaison des séquences LoxP par la présence de marquage correspondant à l'expression du gène *LacZ*.

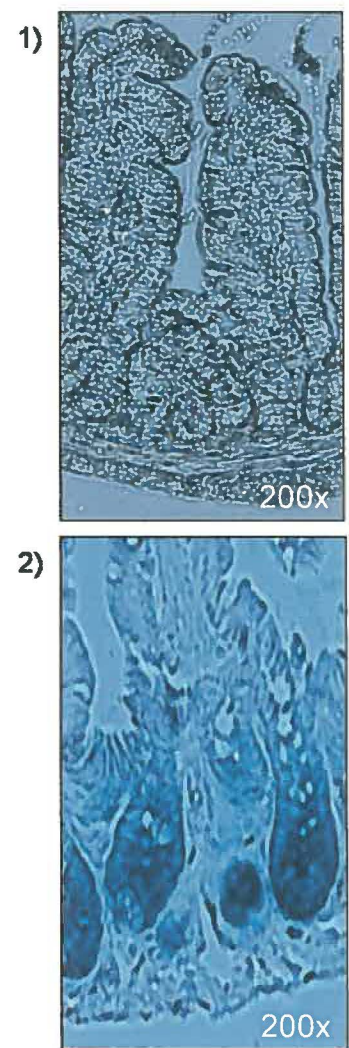
A



B



C



2.2 Expression de la recombinaise Cre au niveau de l'axe crypte-villosité

Les tubes digestifs extraits et soumis à la technique de détection de la β -galactosidase ont ensuite été fixés au PFA 4% puis inclus dans la paraffine pour en faire des coupes histologiques. Par ces coupes, on a pu démontrer que l'expression de la recombinaise Cre est spécifique à l'épithélium intestinal puisque la coloration bleue se limite à ce compartiment au niveau de la muqueuse intestinale (Figure 5-C).

3. Expression des facteurs et récepteurs BMP au niveau de l'épithélium intestinal

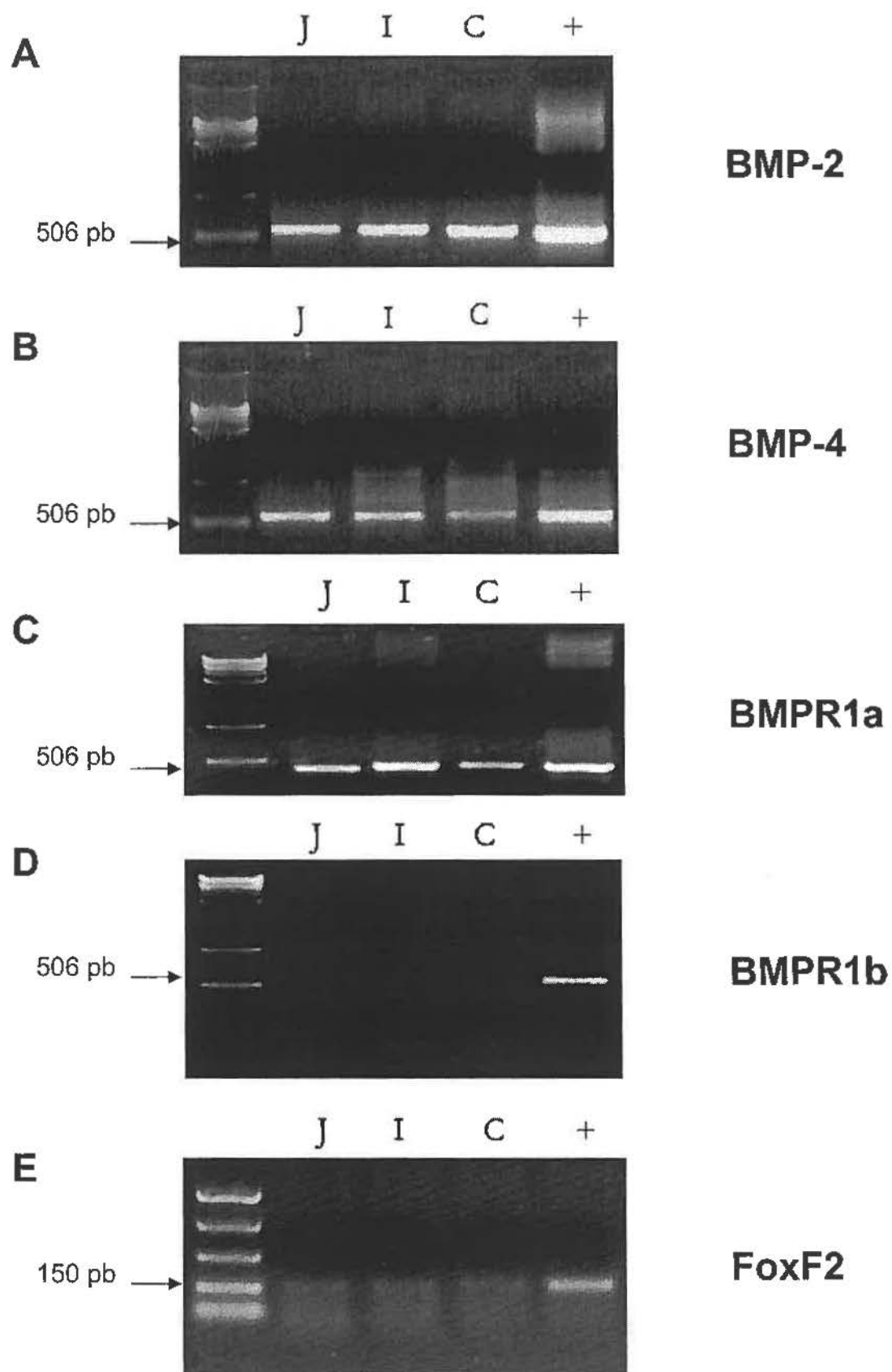
Puisque nous voulons étudier les rôles de la voie BMP dans la régulation des diverses fonctions cellulaires ainsi que du maintien de l'épithélium intestinal, et ce par la délétion du récepteur BMPR1a, nous devons d'abord nous assurer que cette voie de signalisation est active à cet endroit. De plus, comme il le fut discuté plus tôt, plusieurs combinaisons de récepteurs type-I / type-II peuvent être impliqués dans la transduction du signal BMP. Il est donc important de s'assurer que le récepteur BMPR1a participe à cette signalisation BMP au niveau de l'épithélium intestinal et qu'il constitue le seul représentant des récepteurs de type I à ce niveau. Advenant le cas où le récepteur BMPR1b serait présent dans l'épithélium intestinal, il pourrait y avoir une certaine compensation suite à la perte de BMPR1a, ce qui permettrait quand même à la signalisation par la voie BMP d'avoir libre cours.

Afin de faire ces vérifications, nous avons premièrement isolé les cellules de l'épithélium intestinal chez des souris normales adultes et nous en avons extrait l'ARN. L'intestin de ces souris avait été préalablement séparé selon les compartiments suivants : Jéjunum, iléon et colon. Nous avons ensuite effectué une synthèse d'ADNc à partir des extraits d'ARN d'épithélium intestinal afin d'amplifier par PCR des séquences correspondant aux messagers des facteurs BMP-2 et BMP-4 ainsi que des récepteurs BMPR1a et BMPR1b. Nous avons observé que les messagers des facteurs BMP-2 et BMP-4 sont présent au niveau de l'épithélium du jéjunum, de l'iléon et du colon, ce qui indique que la voie BMP est active au niveau intestinal (Figures 6-A et 6-B). De plus, le messenger du récepteur BMPR1a est présent au niveau de l'épithélium intestinal mais pas celui du récepteur BMPR1b (Figures 6-C et 6-D). Cela nous confirme donc que la signalisation par la voie BMP passe uniquement via l'implication de BMPR1a dans l'épithélium intestinal et que le fait d'invalider ce récepteur aura pour conséquence de bloquer complètement la voie BMP à ce niveau.

Afin de s'assurer que nos extraits d'ARN d'épithélium intestinal n'ont pas été contaminés par le mésenchyme lors de la séparation, nous avons tenté d'amplifier par PCR une séquence du messenger de FoxF2 qui constitue un facteur exclusif au mésenchyme. L'absence du messenger de FoxF2 au niveau de nos extraits d'ARN nous confirme qu'il n'y a pas de contamination de ceux-ci par le mésenchyme (Figure 6-E).

**Figure 6. Patron d'expression du messager de facteurs et de récepteurs BMP
au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris**

Des essais en RT-PCR à partir d'extraits d'ARN d'épithélium de divers compartiments intestinaux de souris de 30 jours nous ont permis de réaliser les observations suivantes. Les messagers des facteurs BMP-2 **A)** (produit PCR de 562 pb) et BMP-4 **B)** (produit PCR de 508 pb) sont présents au niveau de l'épithélium du jéjunum, de l'iléon et du colon de souris de type sauvage. Les contrôles positifs (pistes +) sont des banques d'ADNc de cellules 293t surexprimant les facteurs BMP-2 et BMP-4. **C)** Le messager du récepteur BMPR1a est présent au niveau de l'épithélium du jéjunum, de l'iléon et du colon des souris de type sauvage (produit PCR de 440 pb). **D)** Le messager du récepteur BMPR1b n'est pas exprimé dans l'épithélium du jéjunum, de l'iléon et du colon des souris de type sauvage (Produit PCR attendu de 567 pb). Les contrôles positifs (pistes +) des figures C et D consistent en une banque d'ADNc de cœur de souris. **E)** Le messager du facteur FoxF2, qui est normalement exprimé au niveau du mésenchyme seulement, ne se retrouve pas dans nos extraits d'ARN d'épithélium de jéjunum, d'iléon et de colon. Une banque d'ADNc de jéjunum total a été utilisée comme contrôle positif (piste +).



4. Immunolocalisation du récepteur *BMPR1a*

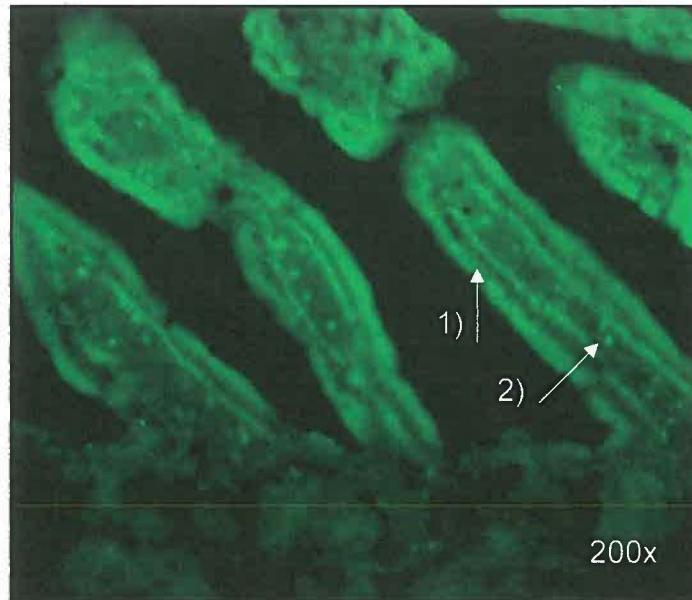
Nous avons tout d'abord visualisé la localisation du récepteur *BMPR1a* au niveau de la muqueuse intestinale, plus particulièrement dans le jéjunum. Pour se faire, nous avons procédé par immunofluorescence indirecte en utilisant un anticorps dirigé contre *BMPR1a* sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de type sauvage (groupe contrôle). Nous avons pu constater que *BMPR1a* se retrouve de manière prédominante au niveau des cellules épithéliales intestinales différenciées (compartiment villositaire). On peut voir que le récepteur se retrouve notamment au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme (Figure 7-A, flèches 1). *BMPR1a* est très faiblement exprimé, voir même absent, au niveau des cryptes. Toutefois, selon la littérature, il serait présent chez les cellules souches de l'épithélium intestinal (HE & al., 2004). On peut aussi voir que *BMPR1a* est présent au niveau de certaines cellules mésenchymateuses (Figure 7-A, flèches 2).

Suite à la génération de nos souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} (groupe expérimental), nous avons procédé à l'immunolocalisation du récepteur *BMPR1a* par immunofluorescence indirecte sur des coupes histologiques de jéjunums adultes afin de vérifier si la délétion a eu lieu au niveau de l'épithélium intestinal. Nous avons comparé le patron de marquage chez notre groupe expérimental avec celui préalablement obtenu chez le groupe contrôle.

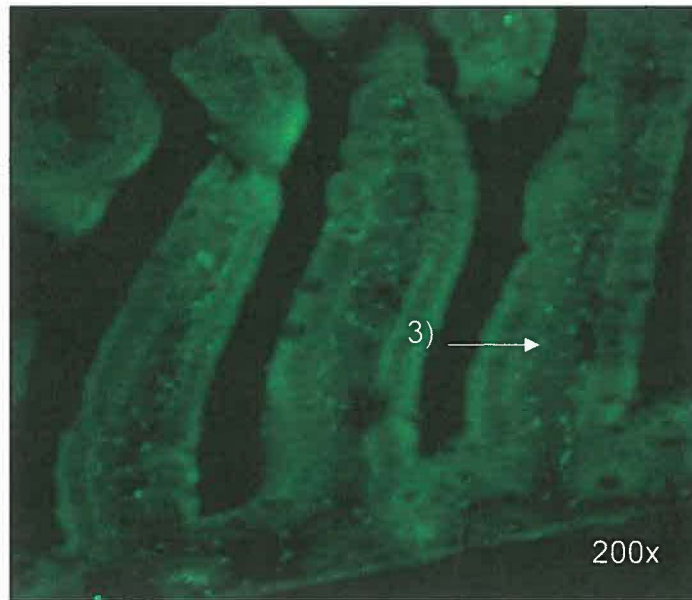
Figure 7. Immunolocalisation du récepteur BMPR1a

Immunofluorescences indirectes sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de 30 jours. L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre le récepteur BMPR1a. La figure **A**) représente l'immunolocalisation du récepteur BMPR1a chez une souris de type sauvage (Grossissement 200x). La flèche **1**) nous indique la présence de BMPR1a au niveau des cellules épithéliales intestinales, plus particulièrement au niveau de l'interface épithélium-mésenchyme. La flèche **2**) nous indique la présence de BMPR1a au niveau de certaines cellules mésenchymateuses. La figure **B**) représente l'immunolocalisation du récepteur BMPR1a chez une souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} (Grossissement 200x). En plus de la perte du marquage correspondant à BMPR1a, on remarque, via l'indication de la flèche **3**), que le récepteur BMPR1a est toujours présent au niveau des cellules mésenchymateuses.

A



B



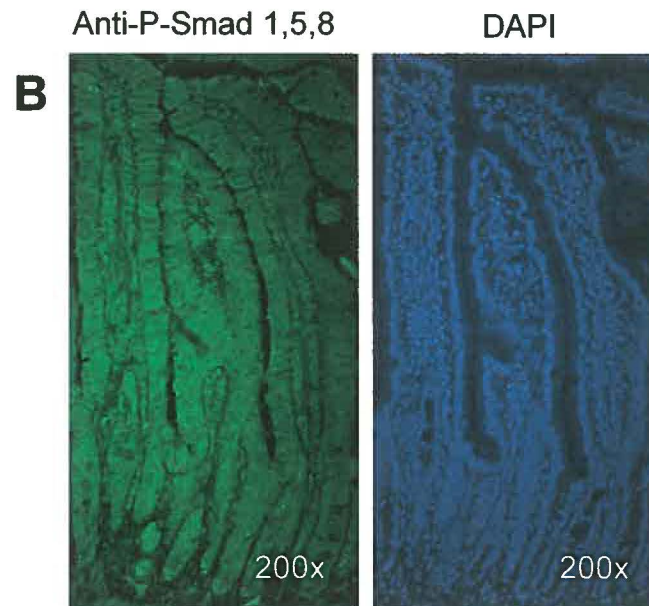
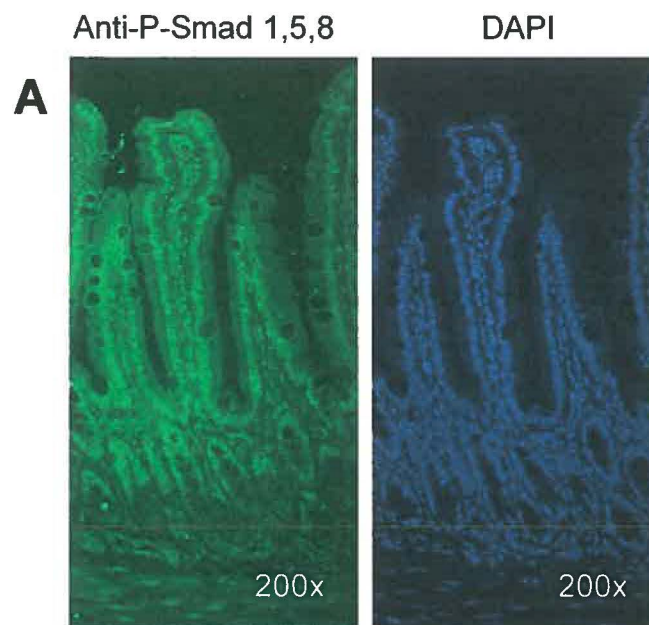
Ainsi, on observe une perte du marquage correspondant à la localisation de BMPR1a au niveau de l'épithélium intestinal chez les souris du groupe expérimental (Figure 7-B). De plus, le fait que le marquage correspondant à la localisation de BMPR1a soit conservé dans le compartiment mésenchymateux chez les souris du groupe expérimental nous démontre que notre délétion s'est faite de manière spécifique à l'épithélium intestinal (Figure 7-B).

5. *Vérification de l'efficacité de la délétion sur la transduction du signal*

La voie de signalisation intracellulaire Smad est normalement responsable de la transduction des signaux provenant de la voie BMP. Cette transduction est faite via l'implication des facteurs Smad-1, Smad-5 et Smad-8. Suite à la confirmation de la perte de BMPR1a au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales intestinales de nos souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP}, nous avons voulu vérifier si la signalisation par la voie BMP était bel et bien inactive chez ces souris. Par immunofluorescence indirecte, sur des coupes histologiques de jéjunums de souris mutantes et contrôles adultes, nous avons procédé à l'immunolocalisation des facteurs Smads-1, 5 et 8 phosphorylés. Pour se faire, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées de ces facteurs Smads. Chez les souris contrôles, on peut voir un marquage fluorescent au niveau des noyaux des cellules épithéliales intestinales (Figure 8-A). Cela signifie que la voie BMP est active à cet endroit et que les R-Smads phosphorylés

Figure 8. Effet de la délétion de *BMPR1a* sur la voie Smad

Immunofluorescences indirectes faites sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de 180 jours. L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre les formes phosphorylées des facteurs Smad-1, 5 et 8. À la figure **A**) à gauche, on observe un marquage fluorescent nucléaire au niveau des cellules épithéliales intestinales d'une souris contrôle (Grossissements 200x). À la figure **B**) à gauche on remarque l'absence de marquage fluorescent nucléaire chez les cellules épithéliales intestinales d'une souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP}. À droite, des figures A) et B), on observe une mise en évidence des noyaux cellulaires par le colorant DAPI (Grossissement 200x).



subissent une translocation nucléaire afin de moduler la transcription de gènes cibles. Par contre, chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}, aucun marquage fluorescent correspondant à la présence des facteurs Smads-1, 5 et 8 n'est présent au niveau des cellules épithéliales intestinales (Figure 8-B). Ainsi, notre délétion épithélium intestinal spécifique de *BMPRIa* provoque une rupture totale de la signalisation par la voie BMP à cet endroit.

6. Impact de la délétion de *BMPRIa* au niveau de la morphologie de la muqueuse intestinale

Afin de faire une première approche de notre hypothèse de travail, nous avons voulu savoir si la délétion de *BMPRIa* au niveau de l'épithélium intestinal pouvait entraîner des irrégularités morphologiques de la muqueuse intestinale. Ces irrégularités pourraient être issues de la perturbation de différents phénomènes cellulaires habituellement sous le contrôle de la voie BMP. Nous avons donc procédé à des colorations hématoxyline et éosine (H&E) afin de mettre en évidence les structures tissulaires de la muqueuse intestinale présente sur des coupes histologiques de jéjunums de souris contrôles et mutantes adultes. Les premières observations, faites en comparant les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} avec les souris contrôles, consistent en un allongement considérable des villosités et des cryptes intestinales chez les mutants. On assiste donc à un épaississement de la muqueuse intestinale des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} (Figure 9). Ce phénotype pourrait être attribuable à une

modulation à la hausse du phénomène de prolifération cellulaire, à une augmentation de la vitesse de migration cellulaire le long de l'axe crypte-villosité ou à une réduction de l'apoptose au niveau de l'épithélium intestinal. Évidemment, l'épaississement de la muqueuse intestinale pourrait être issu d'une combinaison de plusieurs de ces facteurs. De plus, lorsqu'on regarde au niveau des compartiments cryptaux, on remarque que ceux-ci sont beaucoup plus abondants chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} que chez les souris contrôles (Figure 9). Ce phénomène, aussi rapporté par He & al en 2004, serait attribuable à l'augmentation de l'incidence de la fission cryptale. La fission cryptale est un phénomène naturel et habituellement peu fréquent qui consiste en la division d'une crypte afin d'en générer une deuxième via un mécanisme encore peu connu. Toutefois, des évidences pointent vers le fait que le phénomène de duplication des cellules souches serait à l'origine de la fission cryptale. Ainsi, la voie BMP pourrait avoir un rôle important à jouer dans la restriction du phénomène de fission cryptale.

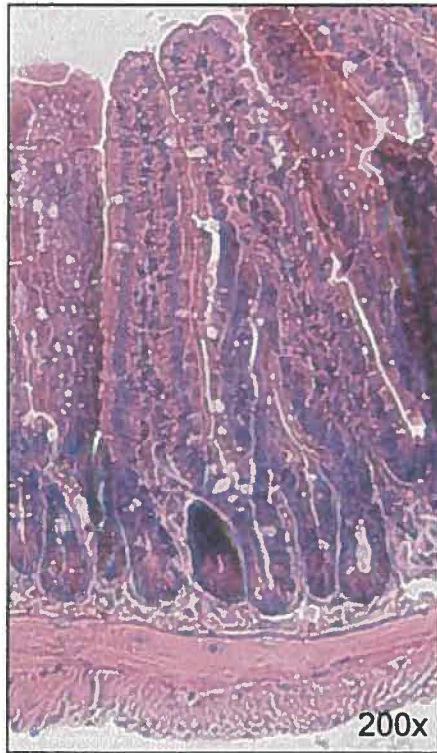
7. *Impact de la délétion de BMPRIa sur la prolifération cellulaire*

La prolifération cellulaire fait partie des phénomènes biologiques qui pourraient être à l'origine de l'épaississement de la muqueuse intestinale chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}. Pour vérifier si nos souris mutantes présentent une augmentation du phénomène de prolifération cellulaire par rapport aux souris

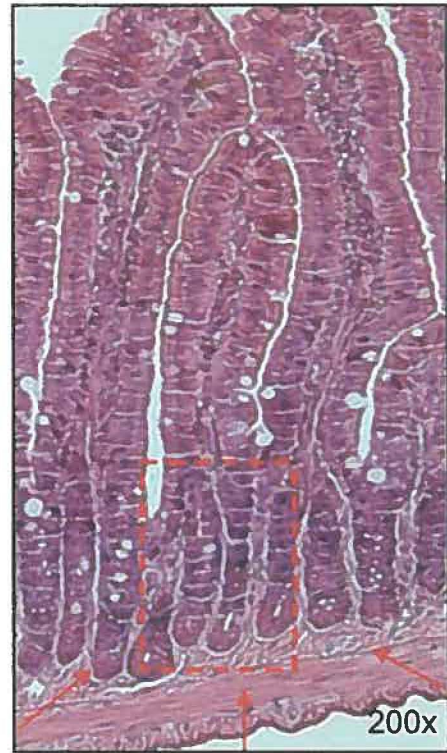
Figure 9. Impacts morphologiques de la délétion de *BMPRIa*

Colorations hématoxyline et éosine faites sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de 180 jours. La figure **A)** représente la muqueuse intestinale d'une souris contrôle tandis que la figure **B)** représente la muqueuse intestinale d'une souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} (Grossissements 200x). On note chez la souris expérimentale un allongement des cryptes et des villosités par rapport à la souris contrôle. De plus, il y a plus de cryptes à la base des villosités chez la souris mutante que chez la souris contrôle (pointillés rouges).

A



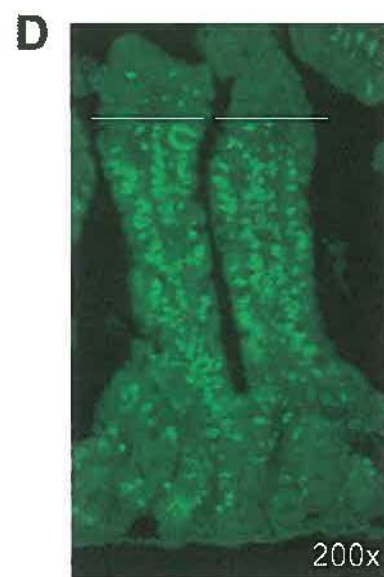
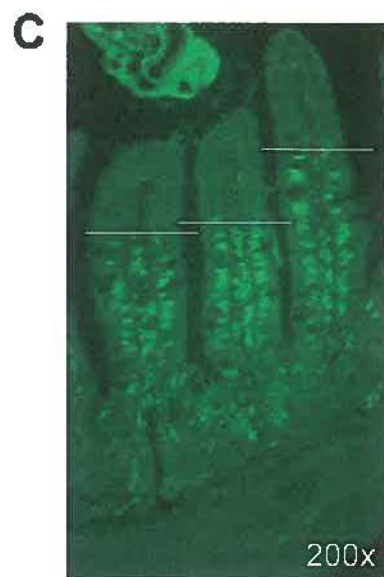
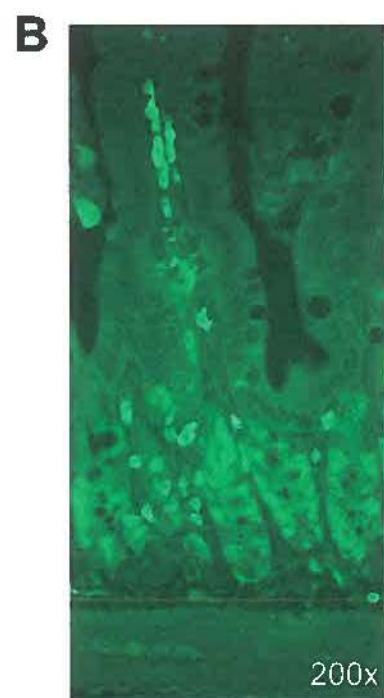
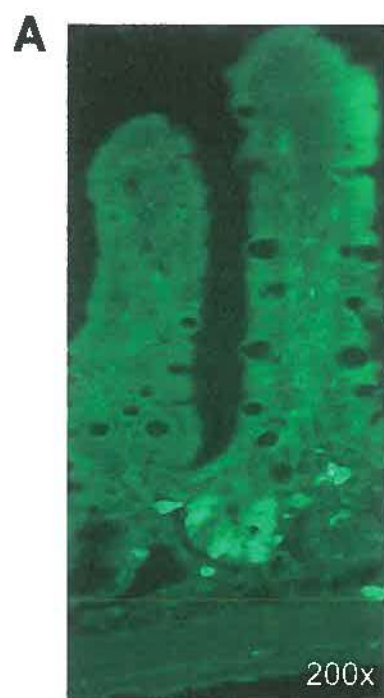
B



contrôles, nous avons fait le suivi de l'incorporation d'un analogue de la thymidine, le BrdU, au niveau de l'ADN des cellules prolifératives. En effet, le BrdU va s'incorporer dans l'ADN des cellules en phase de synthèse d'ADN (phase S) et la localisation de ces cellules sera ensuite possible par immunofluorescence indirecte. L'injection de BrdU aux souris a été réalisée 1h30 avant leur euthanasie. Nous avons ensuite utilisé un anticorps dirigé contre le BrdU, en immunofluorescence indirecte sur des coupes histologiques de jéjunum de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} adultes, afin de vérifier s'il y avait une différence entre ces deux groupes de souris au niveau du nombre de cellules prolifératives. Chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}, on retrouve un plus grand nombre de cellules épithéliales prolifératives au niveau des cryptes intestinales comparativement à ce qu'on observe chez les souris du groupe contrôle. De plus ces cellules prolifératives semblent plus étendues vers le tiers supérieur de la crypte comparativement aux contrôles dans lesquelles ces cellules sont plutôt confinées au tiers inférieur (Figure 10). Donc les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} démontrent une modulation à la hausse du phénomène de prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal, ce qui implique que la voie de signalisation BMP pourrait normalement jouer un rôle dans la répression de ce phénomène.

Figure 10. Impact de la délétion de *BMPRIa* sur la prolifération et la migration cellulaire

Immunofluorescences indirectes faites sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de 180 jours. Ces souris ont reçues une injection de BrdU 1h30, **A)** et **B)**, et 48 heures, **C)** et **D)**, avant leur euthanasie. L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre le BrdU. La figure **A)** met en évidence les cellules prolifératives de l'épithélium intestinal chez une souris contrôle. À la figure **B)**, on peut observer un plus grand nombre de cellules prolifératives épithéliales intestinales chez une souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}. La figure **C)** représente l'avancement, le long de l'axe crypte-villosité, des cellules épithéliales ayant incorporé le BrdU 48 heures auparavant chez une souris contrôle. Les traits blancs indiquent la position du front de migration cellulaire à l'intérieur de cet axe. À la figure **D)**, qui représente un jéjunum de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}, on peut voir que le front de migration cellulaire est plus avancé chez ces souris mutantes que chez les souris contrôles.



8. Analyse de l'expression de divers gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine

Comme il le fût mentionné au cours de l'introduction, la voie Wnt/ β -caténine est reconnue pour être responsable du contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Nous avons donc jugé intéressant d'explorer la possibilité que certains gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine soient exprimés plus fortement chez les souris villine-Cre; $BMPR1a^{LoxP/LoxP}$ que chez les souris du groupe contrôle. En procédant par immunobuvardage, nous avons vérifié les niveaux d'expression de certains gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine chez notre modèle de souris villine-Cre; $BMPR1a^{LoxP/LoxP}$ (groupe expérimental) en comparant avec les résultats obtenus chez le groupe de souris contrôles. Des extractions protéiques ont été réalisées à partir des fractions d'épithélium intestinal, plus particulièrement du jéjunum, isolé chez des souris contrôles et expérimentales adultes. De cette façon, il nous a été possible d'étudier l'expression des facteurs c-Myc, cycline D2 et MMP-7.

8.1 Niveaux d'expression du facteur c-Myc

Le facteur c-Myc est exprimé par un gène cible de la voie Wnt/ β -caténine et est responsable de la transactivation de gènes impliqués dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Ainsi, ce facteur est directement impliqué dans la régulation du phénomène de prolifération cellulaire (SCHMIDT EV, 2004). Nous avons donc tenté de déterminer si c-Myc pouvait subir une modulation de son

expression à l'intérieur de l'épithélium intestinal suite à l'abolition de la signalisation par la voie BMP. Une augmentation de l'expression de c-Myc pourrait suggérer une implication de ce dernier au niveau de notre phénomène d'hyperprolifération cellulaire. Toutefois, les résultats obtenus en immunobuvardage nous démontrent que les niveaux de c-Myc épithélial ne varient pas chez les souris expérimentales par rapport aux souris contrôles (Figure 11-A).

8.2 Niveaux d'expression de la cycline D2

La cycline D2 fait partie de la famille des cyclines, des protéines dont l'expression est cyclique, qui sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les cyclines s'associent à des kinases dont l'activation est cycline-dépendante (CDKs) qui, à leur tour, régulent l'activation de mécanismes essentiels au bon déroulement de la division cellulaire. La cycline D2, dont l'expression est contrôlée par la voie Wnt/ β -caténine, est plus particulièrement impliquée dans le passage de la phase G1 à la phase de synthèse d'ADN (Phase S) (KEHN & al., 2004 et BAEK & al., 2003). Les essais d'immunobuvardage employant un anticorps dirigé contre la cycline D2 nous démontrent que son expression est plus élevée au niveau de l'épithélium intestinal des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} que chez les souris contrôles (Figure 11-B). Cette augmentation de la cycline D2 reflète bien le fait qu'un plus grand nombre de

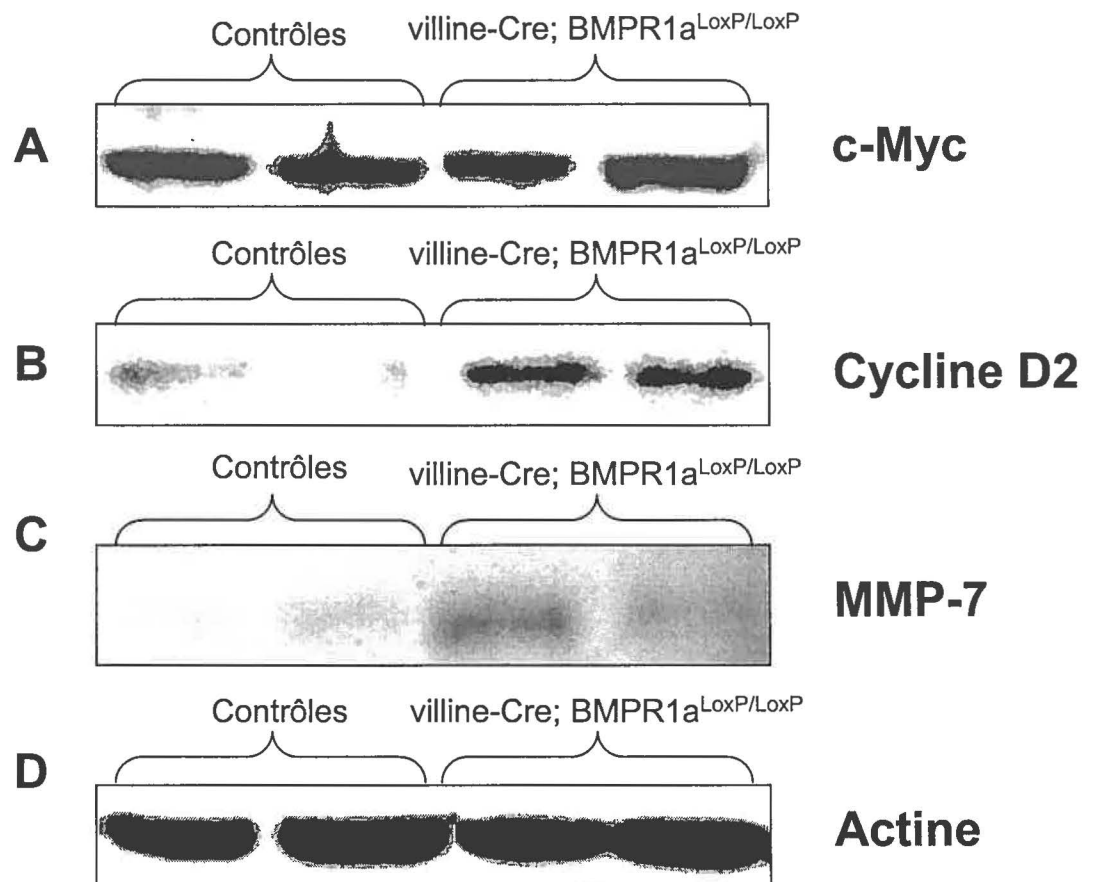
cellules prolifératives sont présentes au niveau de l'épithélium intestinal des souris mutantes.

8.3 Niveaux d'expression de la matrilysine/MMP-7

La voie Wnt/ β -caténine est aussi impliquée dans la mise en place d'un environnement spécifique aux cellules épithéliales intestinales par la régulation de l'expression d'enzymes pouvant remodeler la matrice extracellulaire, les matrice-métallo-protéinases (MMPs). Le gène exprimant la matrilysine/MMP-7 se trouve sous le contrôle de la voie Wnt/ β -caténine. Ainsi, une activation de cette voie de signalisation entraîne une augmentation de l'expression de la matrilysine/MMP-7 (CRAWFORD & al., 1999). La matrilysine/MMP-7 possède comme substrats divers éléments de la matrice extracellulaire tels que l'aggrecane, la tenascine, la décorine, la fibronectine et les collagènes de type I et IV (ZUCKER & VACIRCA, 2004). La matrilysine/MMP-7 est aussi impliquée dans la maturation des cellules de Paneth puisqu'elle est responsable du clivage protéolytique des défensines (VAN ES & al., 2005). Nous avons pu démontrer, par immunobuvardage, que la forme active de la MMP-7 est retrouvée en quantité supérieure au niveau de l'épithélium intestinal des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} comparativement à ce que l'on observe chez les souris contrôles. Jusqu'à présent, nous ne pouvons pas déterminer si cette augmentation de MMP-7 active découle d'une augmentation de l'expression génétique ou de la modulation d'un activateur ou d'un inhibiteur de cette métallo-protéinase. Toutefois, cette

Figure 11. Modulation de l'expression de certaines cibles de la voie Wnt/ β -caténine

Immunobuvardages faits à partir d'extraits protéiques d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRI α* ^{LoxP/LoxP} de 90 jours. Divers anticorps primaires dirigés contre des protéines dont l'expression est régulée par la voie Wnt/ β -caténine telles que **A)** c-Myc, **B)** cycline D2 et **C)** MMP-7 ont été utilisés. L'expression de MMP-7 et de cycline D2 est plus élevée chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles. La figure **D)** représente un immunobuvardage de l'actine, utilisée comme contrôle interne, qui nous confirme qu'une même quantité de protéines a été chargée dans chaque piste lors de la migration sur gel d'électrophorèse.



observation suggère que l'augmentation de l'activité MMP-7 pourrait contribuer à l'établissement d'un nouveau micro-environnement pouvant influencer certaines fonctions cellulaires épithéliales telles que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire.

9. *Impact de la délétion de BMPR1a sur la migration cellulaire*

Le phénomène de migration cellulaire joue un rôle de premier plan dans le processus de renouvellement de l'épithélium intestinal. De plus, il a été démontré que la voie BMP était impliquée dans le contrôle de la migration cellulaire au niveau de la formation des tissus nerveux (GOLDSTEIN & al., 2005). Il est donc possible d'envisager que cette voie de signalisation ait un rôle à jouer dans la régulation de la migration cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal. Afin de vérifier si l'abolition de la signalisation via la voie BMP avait un impact sur le processus de migration cellulaire, nous avons comparé la progression des cellules épithéliales intestinales le long de l'axe crypte-villosité sur une période de 48 heures chez des souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} versus des souris contrôles. Pour se faire, nous avons injecté une dose de BrdU à des souris des deux différents groupes 48 heures avant leur euthanasie. Comme il le fût mentionné plus tôt, le BrdU va s'incorporer au niveau de l'ADN des cellules en phase S au cours des 90 minutes suivant son injection. Par la suite, ces cellules ayant incorporé le BrdU poursuivent leur progression ascendante le long de l'axe crypte-villosité, à l'exception des cellules souches et des cellules vouées à devenir

des cellules de Paneth. Par immunofluorescence indirecte, en utilisant un anticorps dirigé contre le BrdU, sur des coupes histologiques de jéjunum de souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} et contrôles adultes, nous avons pu visualiser le front de migration cellulaire 48 heures post-injection. Ce front de migration est plus avancé vers l'apex de la villosité chez les souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} que chez les souris contrôles (Figure 10-C et 10-D). Cela suggère que la délétion du récepteur BMPR1a entraîne une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales et que la voie de signalisation BMP pourrait être impliquée dans la répression de ce processus.

10. Implication de la E-cadhérine dans la modulation de la migration cellulaire

Comme il le fût rapporté par le groupe de J. Gordon en 1996, l'expression d'un dominant négatif de la N-cadhérine chez des entérocytes provoque une augmentation de leur vitesse de migration tandis qu'une surexpression de E-cadhérine au niveau de ces cellules entraîne le cas contraire (HERMISTON & GORDON, 1995; HERMISTON & al., 1996). La E-cadhérine représente donc un candidat potentiel dans l'explication de notre phénomène d'hypermigration cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal. Il est possible de croire que la voie BMP joue un rôle soit au niveau du contrôle de l'expression de la E-cadhérine ou au niveau de la localisation de celle-ci à l'intérieur de la cellule. Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la E-cadhérine en immunofluorescence indirecte afin de déterminer la localisation de cette protéine au niveau de l'épithélium

intestinal de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et de souris contrôles. Les essais ont été faits sur des coupes histologiques de jéjunums de souris adultes des deux groupes. Nous n'avons pas clairement remarqué de différences au niveau de la localisation de la E-cadhérine chez nos souris mutantes par rapport aux souris contrôles. Toutefois il semble que le signal fluorescent correspondant à la E-cadhérine soit moins intense chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} que chez les souris contrôles (Figure 12-A). Nous avons donc vérifié par immunobuvardage si les niveaux de E-cadhérine étaient plus faibles dans l'épithélium intestinal chez les mutants par rapport aux contrôles. Cette expérience nous a confirmé que les taux de E-cadhérine sont plus bas au niveau de l'épithélium intestinal des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} que chez les souris contrôles (Figure 12-B).

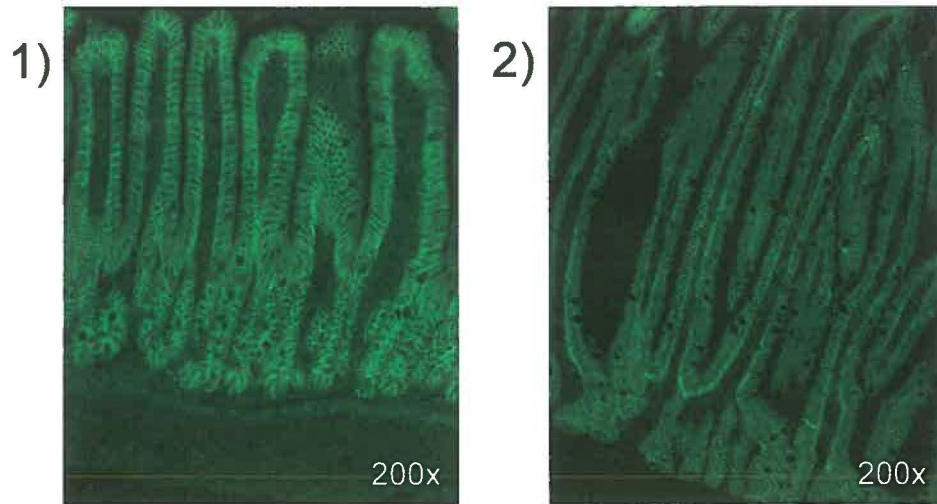
11. Impact de la délétion de BMPRIa au niveau de la différenciation cellulaire

La voie de signalisation BMP est reconnue pour jouer un rôle au niveau de la différenciation cellulaire au sein de divers systèmes physiologiques tel que le processus d'ossification endochondral. Considérant ces faits, notre but était de déterminer si la voie BMP exerce un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire à l'intérieur de l'épithélium intestinal. Afin de voir si la différenciation des entérocytes est affectée par la délétion de *BMPRIa* au niveau de l'épithélium intestinal, nous avons vérifié le patron d'expression de différentes enzymes de la bordure en brosse, qui sont couramment employées comme marqueurs de

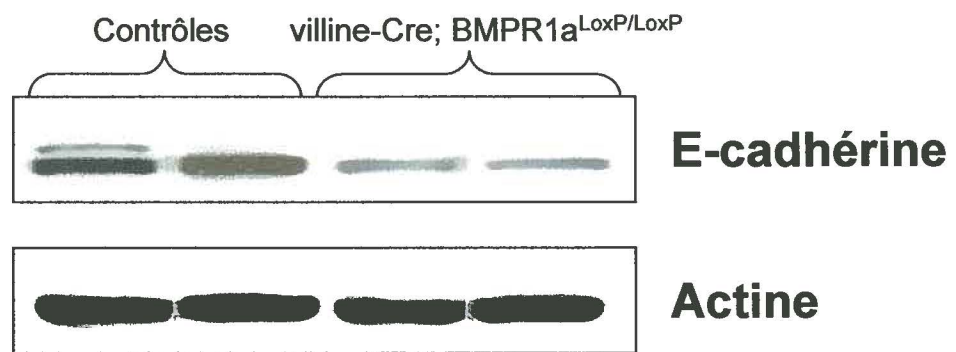
Figure 12. Localisation et expression de la E-cadhérine au niveau de l'axe crypte-villosité chez des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et des souris contrôles

A) Immunolocalisation de la E-cadhérine par immunofluorescence indirecte sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de 30 jours. La figure 1) représente un jéjunum de souris contrôle, tandis que la figure 2) représente un jéjunum de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} (Grossissements 200x). **B)** Immunobuvardages faits à partir d'extraits protéiques d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 90 jours. 1) Un anticorps dirigé contre la E-cadhérine a été utilisé afin de comparer les niveaux d'expression de cette protéine entre les deux groupes de souris. La figure 2) démontre un immunobuvardage de l'actine, utilisée comme contrôle interne, afin de confirmer que des quantités équivalentes de protéines ont été chargées sur chaque piste lors de la migration sur gel d'électrophorèse.

A



B



différenciation entérocytaire, ainsi que des protéines APOBEC-1 et IFABP, qui sont reconnus comme des marqueurs de maturation des entérocytes. Par la suite, notre intérêt s'est porté sur l'impact possible que pourrait avoir la délétion de BMPR1a sur les ratios des différents types cellulaires de la lignée sécrétrice, soit les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth.

11.1 Les enzymes de la bordure en brosse et les marqueurs de maturation

La sucrase-isomaltase et la phosphatase alcaline sont des enzymes de la bordure en brosse des entérocytes pleinement différenciés et qui sont impliqués dans la digestion des nutriments. Tout d'abord, nous avons comparé la localisation et les niveaux d'expression du messenger de la sucrase-isomaltase chez des souris villine-Cre; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} versus des souris contrôles. La localisation du messenger de la sucrase-isomaltase a été faite par hybridation *in situ*, en utilisant une sonde spécifique à une portion du messenger en question, sur des coupes histologiques de jéjunum de souris adultes de chacun des groupes. Pour ce qui est de la mesure des taux d'expression du messenger de la sucrase-isomaltase, nous avons procédé par PCR quantitatif, en utilisant des amorces permettant l'amplification d'une portion de ce messenger, à l'intérieur d'une banque d'ADNc de cellules épithéliales intestinales. Nous n'avons pas remarqué de différence chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles quant à la localisation (Figures 13-A et 13-B) ainsi qu'au niveau de l'expression (Figure 13-C) du messenger de la sucrase-isomaltase. Dans le cas de la phosphatase alcaline, nous

avons utilisé un anticorps dirigé contre celle-ci afin de la localiser, au niveau de l'épithélium intestinal de souris villine-*Cre*; *BMPRIα*^{LoxP/LoxP} et de souris contrôles par immunofluorescence indirecte. Les essais ont été réalisés sur des coupes histologiques de jéjunums de souris mutantes et contrôles adultes. De cette manière, on a pu observer la perte du signal fluorescent correspondant à la phosphatase alcaline habituellement retrouvée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes pleinement différenciés (Figures 14-A et 14-B). Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que l'expression de la phosphatase alcaline est contrôlée par les facteurs Smad-1 et 5 phosphorylés et que si la voie BMP est bloquée, cette régulation ne peut être effectuée (AOKI & al., 2001). Cela conduirait ainsi à l'absence de phosphatase alcaline au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. Ce résultat devra par contre être confirmé par immunobuvardage puisque l'immunofluorescence indirecte ne constitue pas une méthode quantitative.

Toujours dans le but de vérifier si l'abolition de la signalisation par la voie BMP provoque un impact sur la différenciation des entérocytes, nous avons exploré la localisation du facteur IFABP et les taux d'expression du facteur APOBEC-1 au niveau de l'épithélium intestinal. La localisation de IFABP, qui a été déterminée par immunofluorescence indirecte sur des coupes histologiques de jéjunum de souris, n'est pas différente chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIα*^{LoxP/LoxP} par rapport aux souris contrôles (Figures 15-A et 15-B). En ce qui concerne APOBEC-1, qui est un facteur entre autre impliqué dans l'édition du

Figure 13. Localisation et niveaux d'expression du messenger de la SI au niveau de la muqueuse intestinale de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et contrôles

A) et B) Hybridations *in situ* réalisées à l'aide d'une sonde d'ARN spécifique au messenger de la sucrase-isomaltase sur des coupes histologiques de jéjunums de souris **A)** contrôles et **B)** villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 180 jours (Grossissements 200x et 400x). **C)** PCR quantitatif fait à partir de banques d'ADNc d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 220 jours. Des amorces oligonucléotidiques permettant d'amplifier un segment du messenger de SI ont été utilisées. Aucune variation significative de l'expression de la sucrase-isomaltase n'a été rapportée entre les deux groupes de souris.

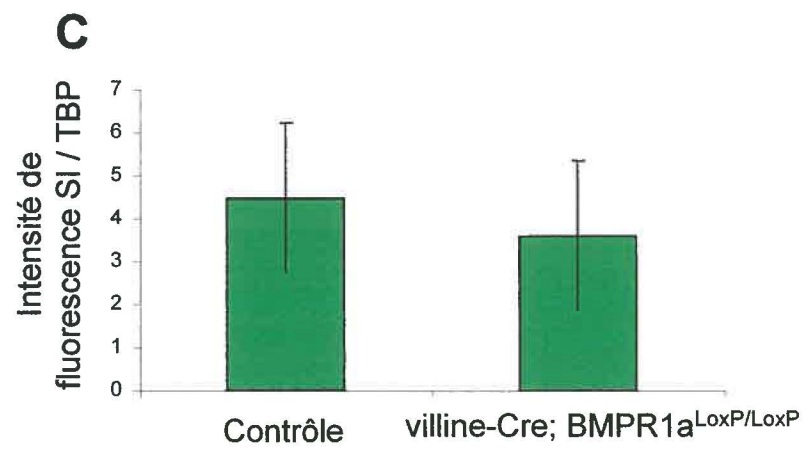
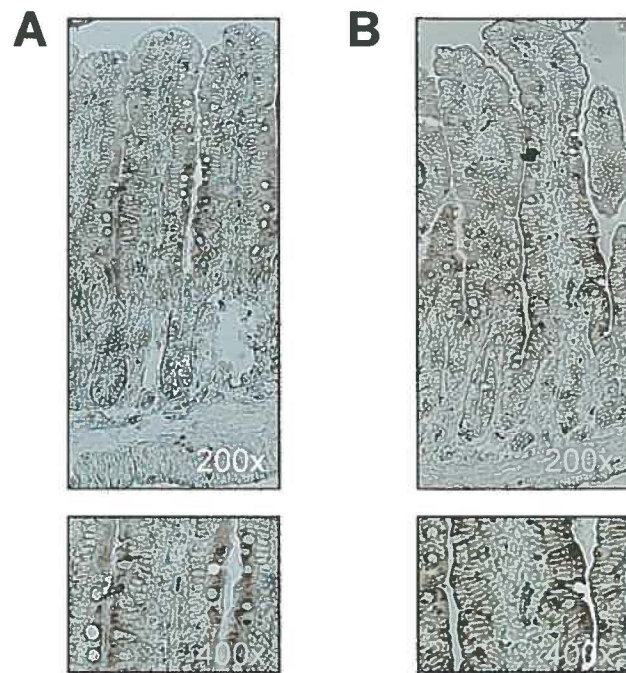


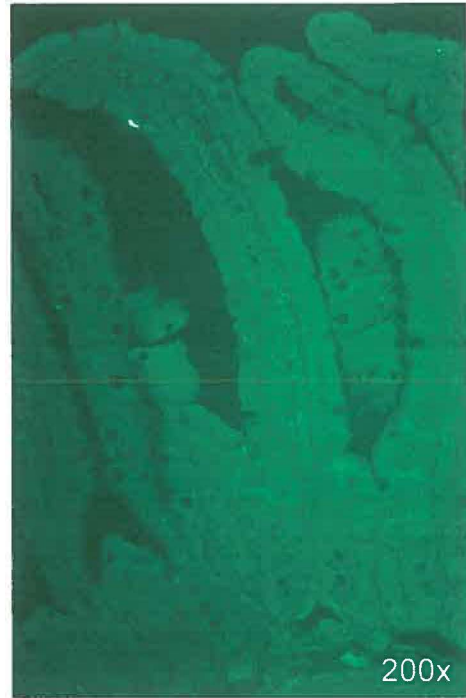
Figure 14. Immunolocalisation de la phosphatase alcaline au niveau de la muqueuse intestinale de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et contrôles

Immunofluorescences indirectes faites sur des coupes histologiques de jéjunums de souris de 180 jours. L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre la phosphatase alcaline. **A)** Jéjunum de souris contrôles. **B)** Jéjunum de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} (Grossissements 200x).

A



B



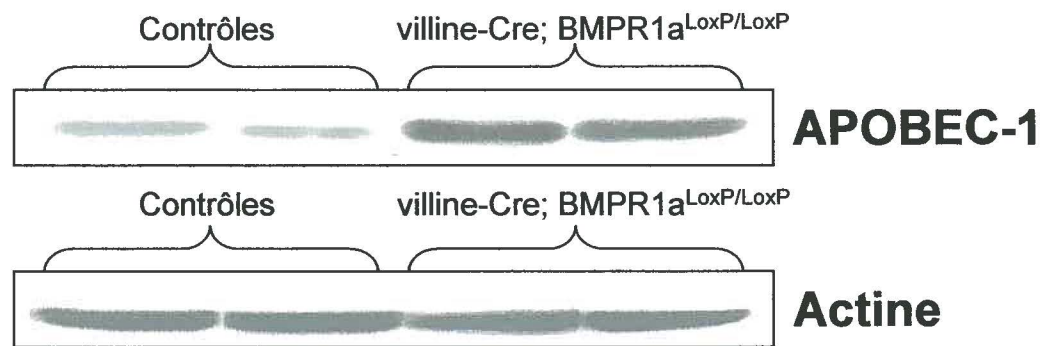
messenger de ApoB-100 pour conduire à la production de ApoB-48, son taux d'expression est plus élevé au niveau de l'épithélium intestinal des souris mutantes que chez les souris contrôles (Figure 15-C). Ces résultats ont été obtenus par immunobuvardage à partir d'extraits protéiques d'épithélium de jéjunums de souris villine-Cre; BMPR1a^{LoxP/LoxP} et contrôles adultes. Cette augmentation des taux d'APOBEC-1, en combinaison avec les autres observations faites sur les différents marqueurs de différenciation, ne nous suggère pas clairement une participation de la voie BMP dans le processus global de la maturation des entérocytes mais par contre, elle nous ouvre la porte sur l'implication possible de cette voie de signalisation dans certains autres processus biologiques intestinaux.

11.2 Les cellules de la lignée sécrétrice

En plus des entérocytes, on retrouve au niveau de l'épithélium intestinal des cellules sécrétrices ayant des fonctions spécialisées. Les principaux types cellulaires appartenant à la lignée sécrétrice sont les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Normalement, on retrouve ces types cellulaires dans des proportions beaucoup plus faibles que les entérocytes. C'est selon la voie décisionnelle du devenir cellulaire que sont établis les ratios de ces différents types de cellules. Par des colorations au bleu d'Alcian, qui marquent spécifiquement les mucines sulfatées retrouvées dans les cellules caliciformes, nous avons voulu vérifier si ce type cellulaire était présent dans un

Figure 15. Localisation et expression de marqueurs de maturation des entérocytes chez des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et des souris contrôles

Des immunofluorescence indirectes visant à immunolocaliser le facteur IFABP ont été réalisées sur des coupes histologiques de jéjunums de souris A) contrôles et B) villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 180 jours (Grossissements 200x). C) Immunobuvardages faits à partir d'extraits protéiques d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 90 jours. 1) Comparaison des niveaux d'expression de APOBEC-1 entre les deux groupes de souris. 2) Immunobuvardage de l'actine, utilisée comme contrôle interne, afin de confirmer que des quantités équivalentes de protéines ont été chargées sur chaque piste lors de la migration sur gel d'électrophorèse.

A**B****C**

ratio différent chez les souris villine-Cre; $BMPRI\alpha^{LoxP/LoxP}$ par rapport aux souris contrôles. Ces colorations ont été effectuées sur des coupes histologiques de jéjunums de souris adultes. Nous avons ainsi pu démontrer de manière significative que le nombre de cellules caliciformes par axe crypte-villosité ne subit aucune variation chez les souris dont la voie BMP est bloquée par rapport aux souris contrôles (Figure 16-E). Toutefois, il semble y avoir une différence au niveau de la maturation terminale des cellules caliciformes (Figure 16-A et B). Le contenu en mucus de ces cellules, chez les souris mutantes, semble emballé d'une manière plus condensée que chez les cellules caliciformes des souris contrôles (Figure 16-C et D). Afin de quantifier et de comparer les ratios de cellules de Paneth chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre le lysozyme, un marqueur des cellules de Paneth, en immunofluorescence indirecte. Ces expériences ont été réalisées sur des coupes histologiques de jéjunums de souris villine-Cre; $BMPRI\alpha^{LoxP/LoxP}$ et contrôles adultes. Le nombre de cellules de Paneth par crypte ne semble pas varier chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles (Figure 17). Finalement, en utilisant un anticorps dirigé contre la chromogranine A en immunofluorescence indirecte, nous avons pu vérifier si le nombre de cellules entéroendocrines par axe crypte-villosité était différent chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles (Figure 18-A et B). La chromogranine A est en fait un marqueur spécifique des cellules entéroendocrines retrouvées au niveau de l'épithélium intestinal. Toujours en utilisant des coupes histologiques de jéjunums de souris villine-Cre; $BMPRI\alpha^{LoxP/LoxP}$ et de souris contrôles adultes,

Figure 16. Les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal chez les souris villine-Cre; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et les souris contrôles

Mise en évidence des mucines sulfatées présentes à l'intérieur des cellules caliciformes de l'épithélium intestinal par la technique de coloration au bleu d'Alcian. Les colorations ont été faites sur des coupes histologiques de jéjunums de souris **A)** contrôle et **B)** villine-Cre; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 180 jours (Grossissements 200x). Les cellules caliciformes ont aussi été analysées en microscopie électronique à transmission comme le démontrent les figures **C)** et **D)** qui proviennent respectivement de souris contrôle et villine-Cre; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} (Grossissements 12000x). Ces analyses en microscopie électronique ont été réalisées sur des coupes de jéjunums de souris contrôles et mutantes de 220 jours. **E)** Comptes statistiques du nombre de cellules caliciformes retrouvées en moyenne par axe crypte-villosité chez chacun des groupes de souris. Ces résultats ont été confirmés comme étant significatifs ($p < 0,05$) par un test de Student et aucune variation significative n'a été observée.

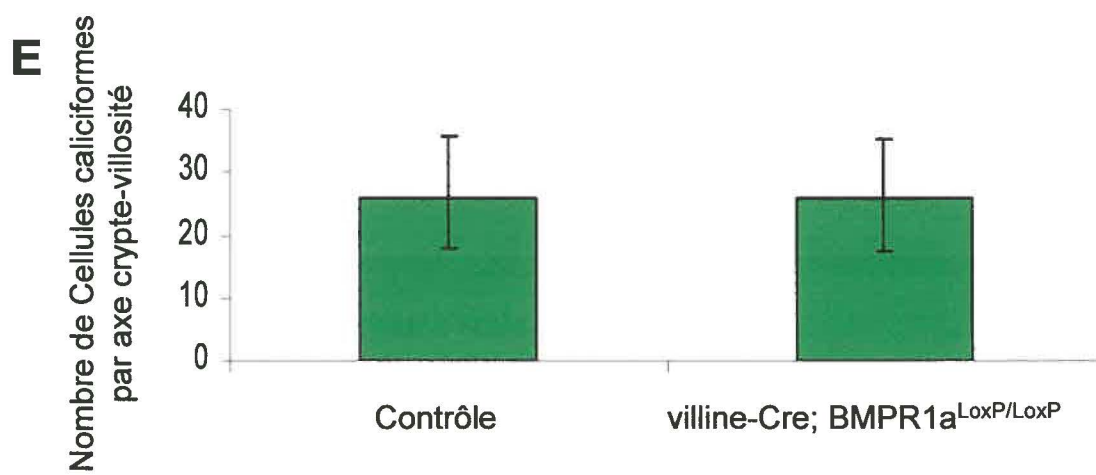
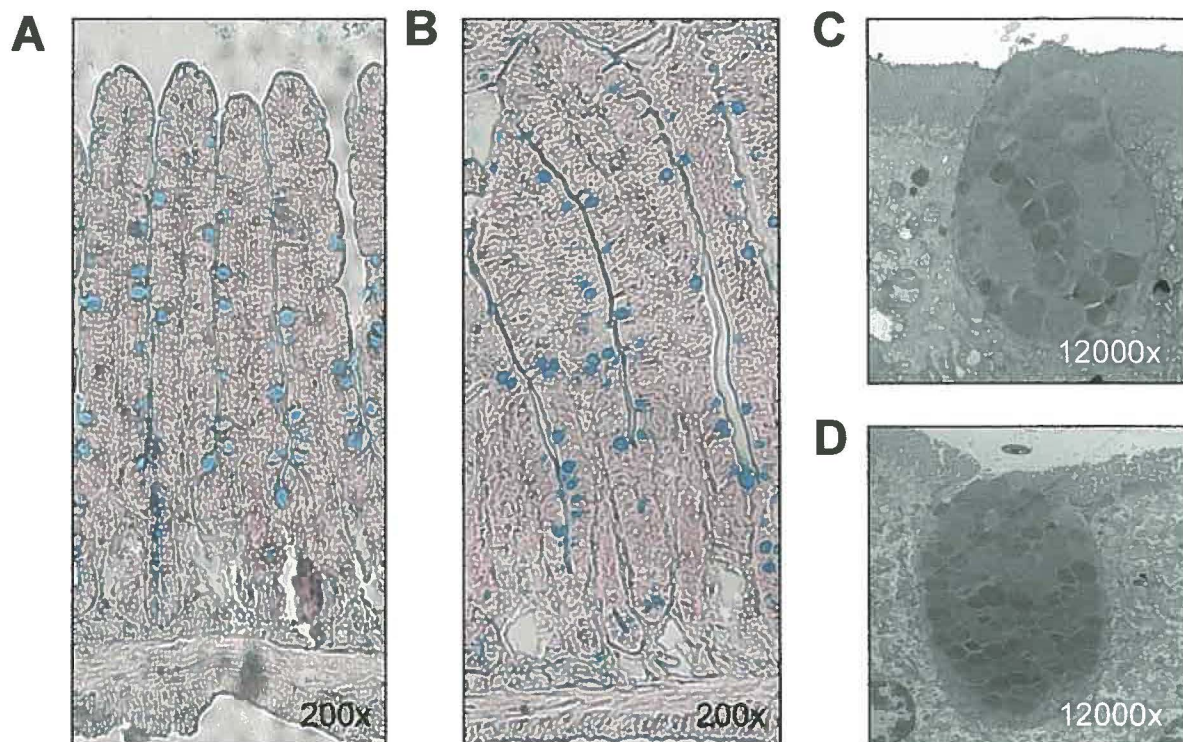
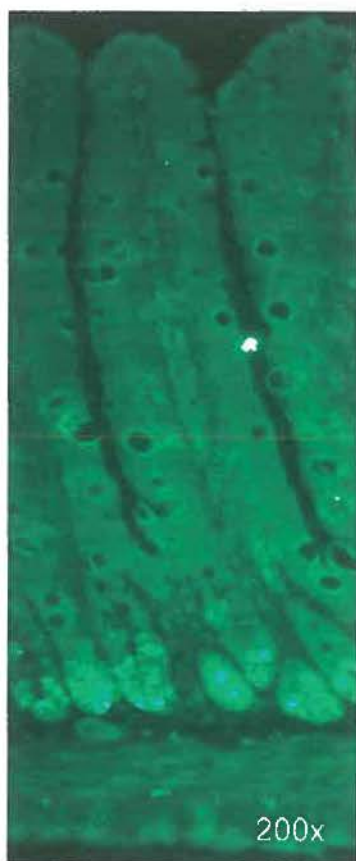


Figure 17. Mise en évidence des cellules de Paneth chez les souris

villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} et les souris contrôles

Immunofluorescences indirectes localisant le lysozyme, un marqueur spécifique des cellules de Paneth retrouvées au niveau de l'épithélium intestinal. Les essais ont été faits sur des coupes histologiques de jéjunums de souris **A)** contrôles et **B)** villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} de 180 jours (Grossissements 200x).

A



B

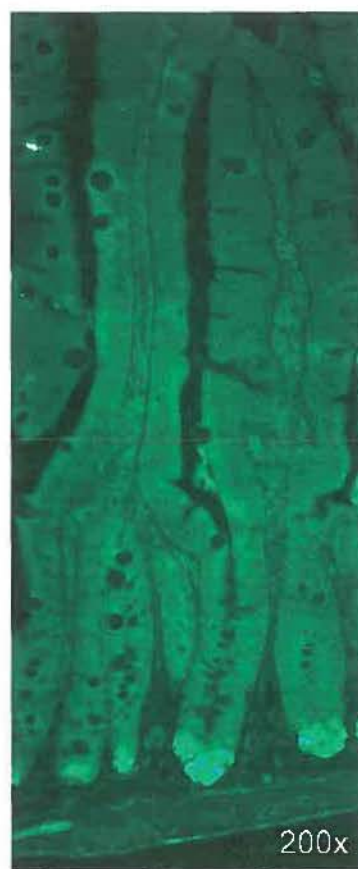
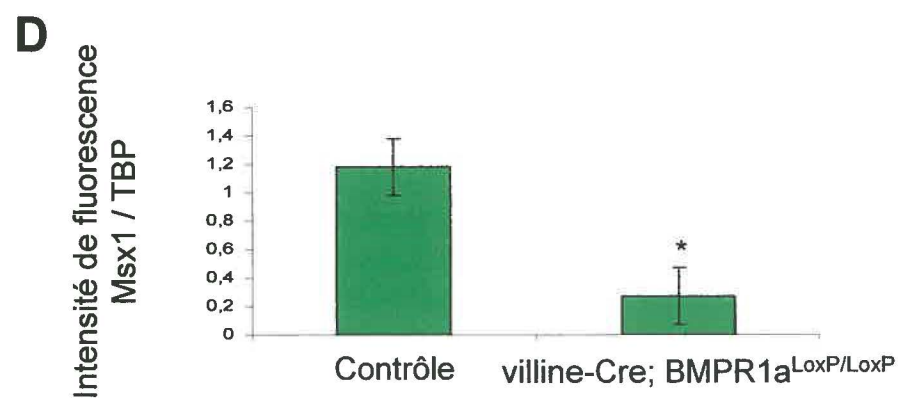
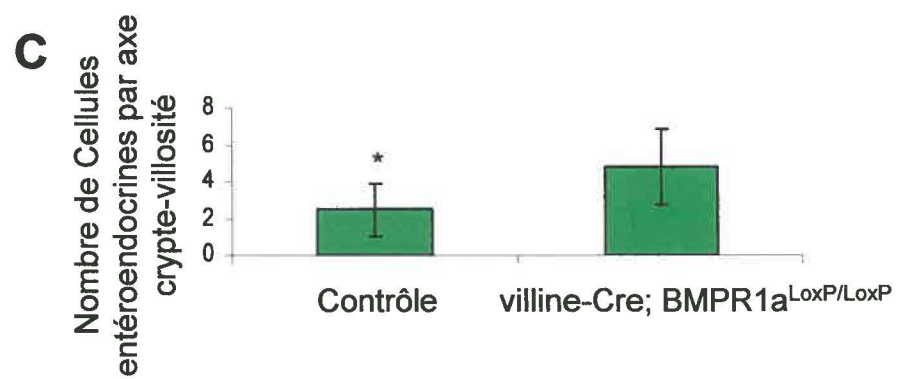
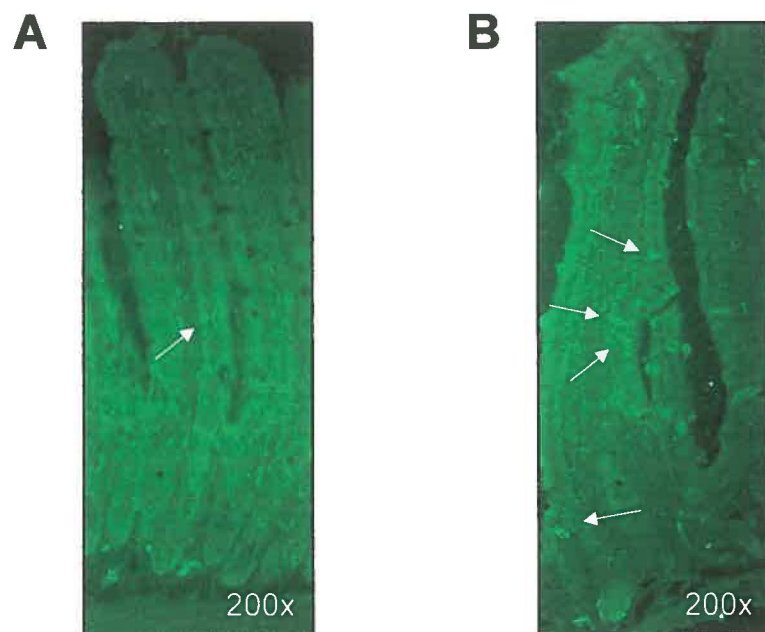


Figure 18. Mise en évidence des cellules entéroendocrines chez les souris

villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et les souris contrôles

Immunofluorescences indirectes faites à l'aide d'un anticorps dirigé contre la chromogranine A sur des coupes histologiques de jéjunums de souris **A)** contrôles et **B)** villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 180 jours (Grossissements 200x). **C)** Comptes statistiques du nombre de cellules entéroendocrines retrouvées en moyenne par axe crypte-villosité chez chacun des groupes de souris. Ces résultats ont été confirmés comme étant significatifs ($p < 0,05$) par un test de Student. **D)** Analyses par PCR quantitatif des niveaux d'expression du messager du facteur *Msx1* chez des souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 220 jours. Les essais ont été faits à partir de banques d'ADNc d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et mutantes.



nous avons démontré qu'il y a une augmentation significative du nombre de cellules entéroendocrines par axe crypte-villosité chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles (Figure 18-C). Cela nous suggère que la voie BMP aurait un rôle à jouer dans la cascade décisionnelle du devenir cellulaire et que l'abolition du signal BMP au niveau de l'épithélium intestinal favoriserait la différenciation en cellules entéroendocrines.

11.3 La différenciation des cellules entéroendocrines

Nous avons précédemment démontré que l'abolition de la signalisation par la voie BMP entraînait une augmentation du nombre de cellules entéroendocrines par axe crypte-villosité. Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons porté notre intérêt sur la régulation de l'expression de différents facteurs impliqués dans la détermination du chemin emprunté par une cellule à l'intérieur de la voie décisionnelle du devenir cellulaire. Le facteur *Msx1*, qui constitue une cible de la voie BMP au niveau du système nerveux, est impliqué dans la répression transcriptionnelle de certains facteurs bHLH dont les facteurs de la famille neurogénine (*Ngn*) (LIU & al., 2004). Le facteur *Ngn3* est impliqué dans la cascade de différenciation des cellules entéroendocrines dans la mesure où sa présence est essentielle à la spécification de ce type cellulaire (LEE & PERREAULT, 2002) (Figure 1). L'expression de la *Ngn3* pourrait être modulée à la hausse chez nos animaux mutants, ce qui expliquerait leur nombre plus élevé de cellules de ce type au niveau de l'épithélium intestinal. Par PCR quantitatif, à

partir de banques d'ADNc de souris villine-Cre; $BMPRIa^{LoxP/LoxP}$ et de souris contrôles adultes, nous avons observé une diminution de l'ordre de 4,3 fois de l'expression du messenger du facteur *Msx1* chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles (Figure 18-D). Cette diminution de l'expression du messenger de *Msx1* nous amènera à tenter de quantifier de la même façon l'expression du messenger de *Ngn3* au niveau de l'épithélium intestinal afin de nous confirmer si la voie BMP exerce un contrôle répressif sur la différenciation en cellules entéroendocrines.

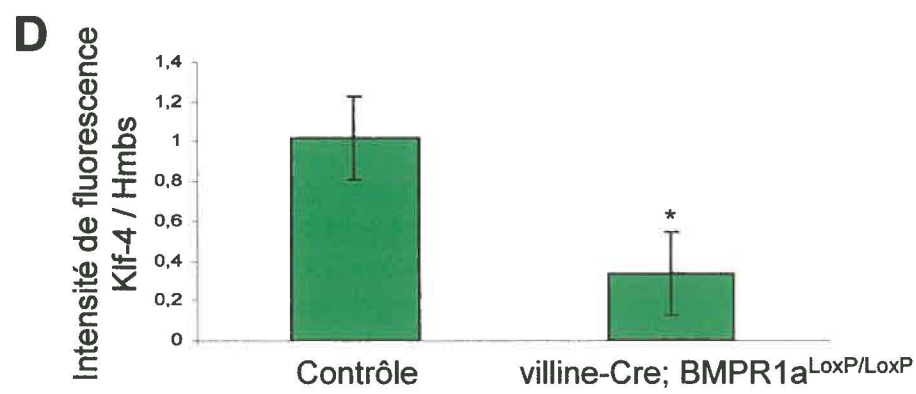
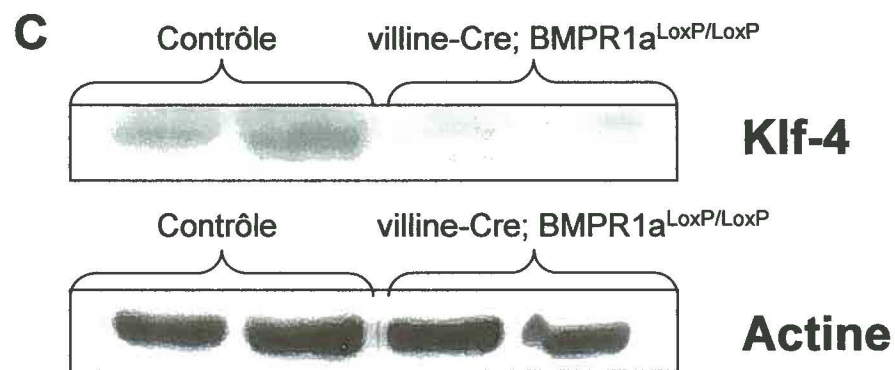
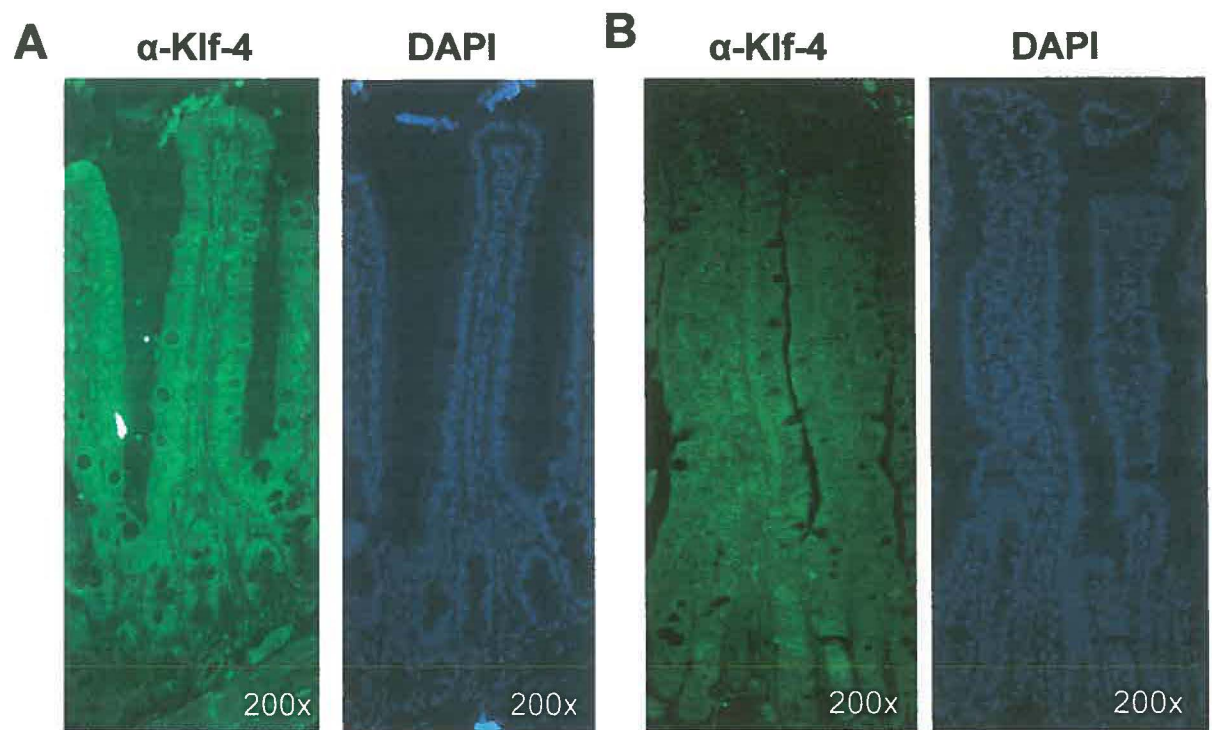
11.4 La maturation des cellules caliciformes

Comme il le fût mentionné précédemment, les cellules caliciformes retrouvées chez les souris villine-Cre; $BMPRIa^{LoxP/LoxP}$ présentent des différences morphologiques apparentes telles que la taille ainsi que la densité de la gouttelette de mucus retrouvée à l'intérieur de ces cellules. Le tout a été confirmé en microscopie électronique à transmission à partir de coupes histologiques de jéjunums de souris villine-Cre; $BMPRIa^{LoxP/LoxP}$ et contrôles (Figure 16-C et D). Il nous reste ainsi à déterminer si des facteurs responsables de la maturation des cellules caliciformes pourraient être affectés suite à l'abolition de la signalisation par la voie BMP. En fait le facteur de transcription à doigts de zinc *Klf-4* a été démontré comme étant essentiel à la maturation adéquate des cellules caliciformes retrouvées au niveau de l'épithélium intestinal (KATZ & al., 2002). Nous avons fait des expériences d'immunolocalisation du facteur *Klf-4*, par

immunofluorescence indirecte, afin de déterminer si la localisation de ce facteur pouvait être affectée via l'absence de signalisation par la voie BMP au niveau de l'épithélium intestinal. Sur des coupes histologiques de jéjunums de souris contrôles, nous avons pu constater que le facteur Klf-4 est normalement retrouvé au niveau du noyau des cellules épithéliales intestinales différenciées (Figure 19-A). Par contre, en regardant au niveau de coupes histologiques de jéjunums de souris mutantes, nous avons remarqué que le marquage fluorescent nucléaire est pratiquement absent (Figure 19-B). Nous avons donc procédé par immunobuvardage et par PCR quantitatif (Figures 19-C et 19-D) afin de vérifier si les niveaux d'expression du messager et de la protéine Klf-4 sont véritablement à la baisse chez les souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} par rapport aux souris contrôles. Les essais en immunobuvardage nous ont démontré que le facteur Klf-4 est présent dans des proportions moindres dans l'épithélium intestinal des souris mutantes par rapport aux niveaux retrouvés chez les souris contrôles. De plus, les analyses par PCR quantitatif nous ont démontré que l'expression du messager de Klf-4 subit une diminution de l'ordre de trois fois au niveau de l'épithélium intestinal lorsque la voie BMP y est inactive. La vue d'ensemble de ces résultats suggèrent fortement que l'expression du facteur Klf-4 est régulée par l'influence de la voie BMP (tel que proposé par KING & al., 2003) au niveau de l'épithélium intestinal et que cette voie de signalisation serait essentielle à la maturation adéquate des cellules caliciformes (KATZ & al., 2002).

Figure 19. Localisation et quantification du facteur Klf-4 au niveau de l'épithélium intestinal des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} et des souris contrôles

A) Immunofluorescence indirecte démontrant, à gauche, la présence du facteur Klf-4 au niveau des noyaux des cellules épithéliales sur des coupes histologiques de jéjunum de souris contrôle de 180 jours (Grossissement 200x). B) À gauche, absence du signal fluorescent correspondant à la présence du facteur Klf-4 au niveau des cellules épithéliales du jéjunum d'une souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 180 jours (Grossissement 200x). À droite des figures A) et B) on observe une mise en évidence des noyaux cellulaires par le colorant DAPI (Grossissements 200x). C) Immunobuvardage du facteur Klf-4 et de l'actine (utilisé comme contrôle interne de quantification protéique) faits à partir d'extraits protéiques d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 90 jours. D) Analyses par PCR quantitatif des niveaux d'expression du messenger du facteur Klf-4 chez des souris contrôles et villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} de 220 jours. Les essais ont été faits à partir de banques d'ADNc d'épithélium de jéjunums de souris contrôles et mutantes.



IV - Discussions et conclusions

Suite à la validation de la capacité du système Cre/LoxP à générer une délétion conditionnelle du récepteur BMPRIa spécifique à l'épithélium intestinal, nous avons pu démontrer qu'une telle modification pouvait totalement supprimer la transduction des signaux BMP au niveau intracellulaire. Nous avons donc pu procéder à l'étude des différents impacts engendrés par l'abolition de la signalisation via la voie BMP au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris. Ces études nous ont permis de démontrer que la voie des BMPs est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation.

1. Morphologie et prolifération cellulaire

D'un point de vue morphologique, on note un épaississement de la muqueuse intestinale caractérisé par un allongement des compartiments cryptaux et villositaires par rapport à la normale. De plus, les compartiments cryptaux sont présents en plus grand nombre chez les souris montrant une délétion conditionnelle du récepteur BMPRIa au niveau de l'épithélium intestinal. Ces observations nous ont poussés à étudier le phénomène de prolifération cellulaire chez nos souris mutantes. Nous avons ainsi pu démontrer que la perte de la

signalisation par la voie BMP au niveau de l'épithélium intestinal provoque une expansion du compartiment prolifératif de la crypte. Des résultats identiques ont été obtenus par le groupe du Dr Li (HE & al, 2004) suite à une délétion conditionnelle de *BMPRIa* au niveau de l'intestin chez la souris via l'utilisation du système Cre/loxP où l'expression de la recombinaise Cre est dirigée par le promoteur Mx1. L'augmentation du nombre de cryptes au niveau de la muqueuse intestinale des souris comportant la délétion épithélium intestinal spécifique de *BMPRIa* nous suggère un rôle de la voie de signalisation BMP sur le contrôle du phénomène de fission cryptale caractérisé par la division symétrique des cellules souches intestinales (BRITTAN & WRIGHT, 2002). Ainsi, la voie de signalisation BMP pourrait jouer un rôle répresseur sur le phénomène de duplication des cellules souches de l'épithélium intestinal. La voie BMP exercerait aussi un effet répresseur au niveau de la division asymétrique des cellules souches de l'épithélium intestinal par un mécanisme de contre-balancement des effets de la signalisation par la voie Wnt/ β -caténine (LEEDHAM & al., 2005). En effet, il a été rapporté que la voie BMP empêche l'inactivation de la phosphatase PTEN et contribue ainsi à contrer la suractivation de la voie Wnt/ β -caténine par la voie PI3K/Akt (TIAN & al., 2005). L'allongement du compartiment prolifératif des cryptes chez nos souris villine-Cre; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} pourrait donc être attribuable à la combinaison des facteurs suivants. D'une part, la suractivation de la voie Wnt/ β -caténine entraînera une augmentation du phénomène de division asymétrique des cellules souches. De plus, l'absence de signalisation par la voie BMP conduit à une augmentation du

nombre de cellules souches par compartiment cryptal dû à l'augmentation de l'incidence du phénomène de division symétrique chez ces cellules. C'est donc par l'intervention de ces deux processus que la crypte comptera plus de cellules à caractère prolifératif.

Des différences majeures ressortent toutefois de nos expériences par rapport à celles du groupe du Dr Li. Le groupe du Dr Li a recensé des polypes au niveau de l'épithélium intestinal de souris *Mx1-Cre; BMPRIa^{LoxP/LoxP}* (HE & al., 2004). De plus, ce phénotype est en accord avec celui observé par le groupe du Dr Clevers au niveau de l'intestin de souris surexprimant le facteur noggin, un antagoniste des facteurs BMP, sous l'influence du promoteur de la villine. L'épithélium intestinal de ces souris démontre la présence de polypes ainsi que de pseudo-cryptes incorporées à l'intérieur des villosités (HARAMIS & al., 2004). C'est d'ailleurs à partir de ces modèles qu'ont été renforcés les résultats publiés par le groupe du Dr Eng, voulant que la dysfonction du récepteur BMPRIa conduise au syndrome JPS (ZHOU & al., 2001; HOWE & al., 2001). Autres faits intéressants, le groupe du Dr Gumucio a généré un modèle de souris transgénique surexprimant un inhibiteur des facteurs Hedgehog au niveau de l'épithélium intestinal via l'utilisation du promoteur de la villine. Les facteurs Hedgehog sont exprimés au niveau de l'épithélium intestinal et exercent une signalisation paracrine au niveau des cellules mésenchymateuses de la muqueuse intestinale pour y influencer, entre autres, l'expression des facteurs BMP. La rupture de la signalisation Hedgehog ainsi engendrée chez les cellules mésenchymateuses

induit une augmentation de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine et une modulation à la hausse du phénomène de prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal. De plus, des pseudo-cryptes ont été observées au niveau du compartiment villositaire chez les souris déficientes en signalisation Hedgehog (MADISON & al., 2005). Dans notre modèle, l'apparition de polypes et la formation de pseudo-cryptes n'ont pas été observées même à des stades avancés de la vie des souris. À partir de ces faits, il est important de prendre conscience que le promoteur *Mx1*, utilisé par le Dr Li afin de diriger l'expression de la recombinaise Cre à l'intérieur de son modèle expérimental, permet l'expression de la Cre au niveau de l'épithélium intestinal mais probablement aussi au niveau des cellules mésenchymateuses (SCHNEIDER & al., 2003; KOJIMA & al., 2003). De plus, considérant que le modèle expérimental du Dr Clevers consiste en une surexpression, par les cellules épithéliales intestinales, d'un facteur extracellulaire causant l'inactivation des facteurs BMP (noggin), il est clair que la signalisation BMP sera aussi affectée au niveau du mésenchyme. Bien entendu, le modèle du Dr Gumucio, qui entraîne une inhibition de la signalisation Hedgehog au niveau l'épithélium intestinal, devrait aussi entraîner une répression de la signalisation par la voie BMP au niveau du mésenchyme. Nous sommes donc les seuls à bénéficier d'un modèle dont les effets sur la voie BMP sont totalement spécifiques à l'épithélium intestinal. Comme il le fût mentionné précédemment (section I), la voie BMP fonctionne de manière autocrine et paracrine. Les facteurs BMP produits par les cellules du mésenchyme intestinal agissent donc au niveau du récepteur BMPRIa présent chez les cellules épithéliales et mésenchymateuses.

Ainsi, l'absence de polypes intestinaux et de pseudo-cryptes chez nos souris mutantes découle probablement du fait que la signalisation par la voie BMP est intacte au niveau du mésenchyme. Afin d'emmener des réponses à ce sujet, il serait intéressant de générer et d'étudier un modèle de souris portant une délétion conditionnelle du récepteur BMPRIa spécifique au mésenchyme intestinal. De plus, l'utilisation d'un modèle cellulaire mésenchymateux comportant une rupture de la signalisation par la voie BMP pourrait s'avérer un outil intéressant afin de répondre à cette question.

Le phénomène d'hyperprolifération cellulaire, retrouvé au niveau de l'épithélium intestinal des souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}, est fort possiblement impliqué dans l'allongement des compartiments villositaires observé chez ces souris. Toutefois, il ne faut pas négliger la possibilité que le phénomène d'apoptose puisse être influencé par la voie de signalisation BMP au niveau de l'épithélium intestinal. Il faudrait donc vérifier, au cours d'expériences subséquentes, si les mécanismes apoptotiques subissent une modulation au niveau de l'épithélium intestinal de souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} par rapport à ce qu'on retrouve habituellement chez des souris normales.

2. Influence de la voie BMP sur la voie Wnt/ β -caténine

Considérant les faits rapportés dans la littérature visant à démontrer une influence de la voie BMP dans le contrôle de la signalisation par la voie Wnt/ β -

caténine, nous avons porté notre intérêt sur la modulation possible de l'expression de certaines cibles de cette voie de signalisation chez nos souris mutantes. Ainsi, nous avons pu démontrer que les protéines cycline D2 et MMP-7 active sont présentes en quantités supérieures, au niveau de l'épithélium intestinal, chez des souris portant la délétion conditionnelle de *BMPRIa*, comparativement à ce qui est retrouvé chez des souris normales. L'augmentation de l'expression de la cycline D2, qui est impliquée dans la progression du cycle cellulaire, illustre bien le phénomène d'hyperprolifération cellulaire de l'épithélium intestinal chez les souris mutantes. Pour ce qui est de l'augmentation de l'activité MMP-7 chez les souris mutantes par rapport aux souris normales, il nous est impossible pour le moment d'affirmer que cette modulation est attribuable à une augmentation de l'expression du gène *MMP-7*. En effet, l'augmentation de l'activité de la MMP-7 chez nos souris mutantes pourrait être associée à une influence de la voie BMP sur l'activité ou l'expression de certains inhibiteurs et/ou activateurs *in situ*, qui viendraient perturber l'équilibre existant entre la forme active et la forme inactive de cette métallo-protéinase. De plus, un immunobuvardage impliquant un anticorps dirigé à la fois contre la forme active et la forme inactive de la MMP-7 nous permettrait de déterminer si l'expression de celle-ci est modulée ou non suite à la délétion du récepteur *BMPRIa* au niveau de l'épithélium intestinal. Toutefois, si on considère l'augmentation de l'activité de la MMP-7 chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles, il est possible que cette modulation entraîne certaines perturbations au niveau de la muqueuse intestinale. Par exemple, la MMP-7 est essentielle à la maturation adéquate des cellules de

Paneth dans la mesure où cette enzyme est responsable de l'activation protéolytique des défensines et des cryptidines (VAN ES & al., 2005). Il est donc plausible que l'activité des défensines et des cryptidines soit modulée à la hausse, par rapport à la normale chez les cellules de Paneth des souris mutantes. De plus, la suractivation de la MMP-7 pourrait entraîner une réorganisation de la matrice extracellulaire chez nos souris mutantes, ce qui pourrait avoir comme conséquence l'établissement d'un nouveau micro-environnement pouvant influencer la concentration de certains facteurs solubles aux abords des cellules. Cette variation de concentration effective de facteurs extracellulaires entraîne une modification de la disponibilité de ces facteurs pour la liaison à leur récepteur respectif. De plus, la réorganisation de la matrice extracellulaire pourrait, du même coup, influencer la signalisation intracellulaire via certaines intégrines au niveau de l'épithélium intestinal (POZZI & ZENT, 2003). Des phénomènes tels que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire pourraient donc être affectés par l'augmentation de l'activité de la MMP-7 qu'entraîne l'abolition des signaux BMP au niveau de l'épithélium intestinal. Finalement, le fait de quantifier l'expression totale de la protéine MMP-7 à l'aide d'un anticorps reconnaissant sa formes active et inactive nous permettrait de confirmer que la modulation de l'activité MMP-7 est bien le résultat de la sur-activation de la voie Wnt/ β -caténine chez nos souris villine-*Cre*; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP}.

3. La voie BMP et la migration cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal

Suite à nos essais de migration cellulaire *in vivo* à l'intérieur de l'épithélium intestinal de souris mutantes et contrôles, nous pouvons suggérer que l'abolition de la signalisation par la voie BMP accélère la vitesse de migration des entérocytes. Afin de fournir des explications à ce sujet, plusieurs options sont à considérer. Premièrement, si on se rapporte aux travaux réalisés par le groupe du Dr Gordon en 1996, il est possible d'envisager une modulation de l'expression ou de la localisation de la protéine E-cadhérine suite à la suppression des signaux BMP. En effet, selon le groupe du Dr Gordon, une surexpression de la E-cadhérine chez la souris provoque une diminution de la vitesse de migration des entérocytes le long de l'axe crypte-villosité (HERMISTON & al., 1996), tandis que l'expression d'un dominant négatif de la N-cadhérine conduit à l'accélération du processus migratoire chez ces mêmes cellules (HERMISTON & GORDON, 1995). Nous avons donc effectué l'immunolocalisation de la E-cadhérine à l'intérieur de nos souris mutantes et contrôles afin de réaliser les observations suivantes.

D'une part, la localisation de la E-cadhérine, à l'intérieur de l'épithélium intestinal, semble affectée par l'invalidation du récepteur BMPRIa, dans la mesure où l'on observe une plus forte présence de cette protéine au niveau de la membrane basilaire des entérocytes chez les souris mutantes par rapport aux

souris contrôles. Le changement de distribution de la E-cadhérine, chez les entérocytes n'exprimant pas le récepteur BMPR1a, nous pousse donc à porter notre intérêt sur les facteurs impliqués dans le contrôle de la localisation de cette protéine. La caténine p120 constitue un régulateur de l'acheminement de la E-cadhérine au niveau des complexes d'adhésion cellule-cellule. De plus, la caténine p120 joue aussi un rôle de régulateur de l'activité de protéines GTPases telles que Rac1 et RhoA, pour ainsi affecter la dynamique du cytosquelette d'actine (REYNOLDS & ROCZNIAK-FERGUSON, 2004). Ainsi, les résultats obtenus suite à l'étude du phénomène de migration cellulaire au niveau de notre modèle expérimental suggère une modulation de l'activité de la caténine p120 entraînée par l'invalidation du récepteur BMPR1a. De récentes observations au laboratoire du Dr Perreault nous ont démontré que la bordure en brosse des entérocytes de souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP} semble moins dense et moins rigide comparativement à ce qui a été observé chez des souris contrôles. Ces observations nous fournissent ainsi des évidences sur une possible modulation de la dynamique du cytosquelette d'actine au niveau des entérocytes exempts de signaux BMP qui pourrait aussi être attribuable à la modulation de l'activité de la caténine p120. Toutefois, il n'y a pas que l'implication possible de la caténine p120 dans notre phénomène d'hypermigration entérocytaire qui nous pousse à croire que l'invalidation du récepteur BMPR1a peut entraîner un remodelage du cytosquelette d'actine. La phosphatase PTEN a été démontrée comme étant un régulateur négatif de la motilité cellulaire par son action répressive sur l'activité des protéines Rac1 et Cdc42. L'inhibition de l'activité de ces protéines prévient

le remodelage du cytosquelette d'actine qui permet de générer des structures en filopodes et lamellipodes, essentielles à la migration cellulaire (LILIENTAL & al., 2000). Comme il en a été fait mention à l'intérieur des travaux du Dr Li, la voie BMP joue un rôle important dans l'inhibition de l'inactivation de PTEN (HE & al., 2004). Il est donc possible que l'invalidation du récepteur BMPR1a au niveau des cellules épithéliales intestinales entraîne une suractivation des protéines Rac1 et Cdc42, via l'inactivation de PTEN, ce qui aurait pour effet d'influencer la dynamique du cytosquelette d'actine. Il est aussi à noter que la PI3K, qui constitue un antagoniste cellulaire de PTEN, serait essentielle au maintien de l'intégrité des jonctions adhérentes et de leur association au cytosquelette d'actine via l'implication de la protéine hDlg (LAPRISE & al., 2002; LAPRISE & al., 2004).

Les niveaux de fluorescence observés lors de l'immunolocalisation de la E-cadhérine nous ont semblé de plus faible intensité au niveau de l'épithélium intestinal de nos souris mutantes par rapport à ce que nous avons observé chez des souris contrôles. Nous avons donc comparé les niveaux d'expression de la E-cadhérine entre nos deux groupes de souris. Cela nous a permis de constater que l'invalidation du récepteur BMPR1a entraîne une diminution de l'expression de la protéine E-cadhérine.

Ainsi, ces résultats ouvrent la porte sur une hypothèse proposant que l'augmentation de la vitesse de migration des entérocytes serait causée par la

déstabilisation des complexes de jonctions adhérentes, en conjugaison avec une modulation de la dynamique du cytosquelette d'actine suite à la perte de la signalisation par la voie BMP (HERMISTON & GORDON, 1995).

4. La voie BMP et la différenciation cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal

Afin de déterminer si la délétion conditionnelle de *BMPRIa*, au niveau de l'épithélium intestinal, cause une perturbation du processus de différenciation entérocytaire, nous avons étudié l'expression de quatre marqueurs de différenciation propres aux entérocytes, soit la sucrase-isomaltase, la phosphatase alcaline ainsi que les facteurs IFABP et APOBEC-1. Aucun changement n'a été remarqué au niveau de l'expression et de la localisation du messenger de la sucrase-isomaltase chez nos souris mutantes par rapport à des souris contrôles. Ces observations sont en accord avec le fait que ce ne sont pas les facteurs Smads qui sont responsable de la régulation de l'expression de la SI au niveau de son promoteur mais plutôt les facteurs HNF-1 α , GATA-4 et Cdx2 (BOUDREAU & al., 2002). En ce qui concerne la localisation du facteur IFABP, les expériences en immunofluorescence indirecte ne montrent aucune différence entre les deux groupes de souris. Par contre, on note une augmentation de l'expression du facteur APOBEC-1 ainsi que la perte de la phosphatase alcaline au niveau de la bordure en brosse des entérocytes n'exprimant pas le récepteur BMPRIa. À partir de ces résultats, nous ne pouvons pas affirmer que la voie de signalisation BMP exerce un rôle essentiel à l'intérieur du processus global de différenciation

entérocytaire. Toutefois, nous pouvons suggérer que la voie BMP a une influence particulière sur le contrôle de l'expression de certains gènes actifs au cours de ce processus. L'absence de phosphatase alcaline au niveau de la bordure en brosse chez nos souris mutantes peut être expliquée par le fait que l'induction de l'expression de cette enzyme est contrôlée par les facteurs Smad-1 et 5 phosphorylés. Ainsi, l'abolition des signaux transmis par la voie BMP pourrait empêcher l'induction de l'expression de la phosphatase alcaline (AOKI & al., 2001). L'augmentation des taux d'expression de la protéine APOBEC-1 au niveau des entérocytes dépourvus de signaux provenant de la voie BMP ne nous fournit pas d'évidences quant à la participation de cette voie de signalisation à l'intérieur du processus de différenciation. Par contre, APOBEC-1 possède une activité cytidine déaminase séquence-spécifique, catalysant l'édition d'une cytidine en uridine à l'intérieur d'un messenger. APOBEC-1 est reconnue pour son implication dans l'édition du messenger de l'apolipoprotéine ApoB-100, causant l'introduction d'un codon d'arrêt permettant la production de la protéine ApoB-48 au niveau des entérocytes. À partir de cette information, il nous est possible d'envisager une augmentation des taux de ApoB-48, due à la suractivation de ce phénomène d'édition chez nos souris mutantes. La surproduction de ApoB-48 pourrait entraîner une perturbation du métabolisme des lipides se traduisant, par exemple, par une augmentation de l'efficacité d'assemblage des chylomicrons (KENDRICK & al., 2001). Mais les conséquences de l'augmentation des taux de la protéine APOBEC-1 ne se limitent pas au métabolisme des lipides. En effet, APOBEC-1 possède la capacité de lier

certaines messagers au niveau de séquences riches en adénosine et en uridine à l'intérieur de la région non traduite en 3'. Cette association entre APOBEC-1 et ces messagers en question favorise la stabilisation de ceux-ci. Parmi les messagers pouvant être stabilisés par APOBEC-1, on retrouve les facteurs c-myc, TNF- α , Il-2, Il-8 et COX-2 (ANANT & al., 2004). Ainsi, l'augmentation de l'expression de APOBEC-1 à l'intérieur de l'épithélium intestinal des souris villine-Cre; *BMPRIa*^{LoxP/LoxP} pourrait entraîner une modulation de la réponse inflammatoire.

5. Implication de la voie BMP dans la voie du devenir cellulaire

Suite à nos expériences, en rapport avec les principaux types cellulaires de la lignée sécrétrice à l'intérieur de l'épithélium intestinal, nous avons pu démontrer que la suppression de la voie BMP conduisait à l'augmentation du nombre de cellules entéroendocrines par axe crypte-villosité, sans pour autant affecter les ratios de cellules caliciformes et de cellules de Paneth. Toutefois, en ce qui concerne les cellules caliciformes, nous avons remarqué des différences morphologiques pouvant suggérer une déficience au niveau du processus de maturation. Il nous est impossible pour le moment de prédire l'impact physiologique que pourrait amener cette déficience dans la maturation des cellules caliciformes chez nos souris mutantes. Afin d'expliquer ces différents phénomènes concernant les principaux types cellulaires de la lignée sécrétrice,

nous avons porté notre attention sur divers facteurs impliqués au niveau de la voie décisionnelle du devenir cellulaire (voir figure 1).

D'une part nous avons démontré que la délétion du récepteur BMPR1a entraînait une diminution de l'expression du facteur Klf-4, qui constitue un facteur de transcription essentiel à la différenciation terminale des cellules caliciformes (KATZ & al., 2002). De plus, l'expression du gène *Klf-4* est reconnue pour être sous l'influence de la voie de signalisation BMP (KING & al., 2003). Afin de confirmer l'implication de la voie de signalisation BMP au niveau de la maturation des cellules caliciformes, il serait intéressant de vérifier si l'expression d'un marqueur spécifique de ce type cellulaire, *Muc2*, subit une modulation chez nos souris mutantes par rapport à des souris contrôles.

Afin d'expliquer l'augmentation du nombre de cellules entéroendocrines par axe crypte-villosité entraînée par l'invalidation du récepteur BMPR1a, nous avons, dans un premier temps, démontré la diminution de l'expression du gène *Msx1* chez nos souris mutantes par rapport aux souris normales. Le facteur *Msx1*, dont l'expression est reconnue pour être induite par la voie BMP, agit en tant que répresseur transcriptionnel de certains facteurs de transcription de la famille bHLH. Des études faites au niveau du développement du tube neural dorsal ont démontré que *Msx1* avait la capacité d'inhiber l'expression des facteurs de la famille neurogénine (Ngn) (LIU & al., 2003). Le facteur *Ngn3* a été démontré comme étant essentiel, dans un premier temps, à l'émergence de la population de

cellules entéroendocrines mais aussi à la différenciation terminale des cellules entéroendocrines de type A, D et G. En ce qui concerne les cellules entéroendocrines de type EC, celles-ci ne se différencient pas selon une voie Ngn-3 dépendante. Toutefois, une déficience en Ngn-3 conduit à une réduction de la population de ce type de cellules (LEE & PERREAULT, 2002). Ainsi, la diminution de l'expression de *Msx1* pourrait entraîner une augmentation de l'expression de *Ngn3* et conduire à l'augmentation de la population de cellules entéroendocrines au niveau de l'épithélium intestinal chez nos souris mutantes. Il est aussi possible qu'à l'intérieur de la population de cellules entéroendocrines, chez les souris villine-*Cre*; *BMPR1a*^{LoxP/LoxP}, nous retrouvions un ou plusieurs sous-types cellulaires (A, D ou G) qui soient présent dans des proportions plus importantes par rapport à la normale. L'analyse des ratios des différents types de cellules entéroendocrines pourra être réalisée via l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques à chacun de ces sous-types cellulaires.

6. Perspectives

En somme, la délétion conditionnelle du récepteur *BMPR1a* au niveau de l'épithélium intestinal entraîne une multitude d'impacts, tant au niveau du maintien tissulaire qu'au niveau de la régulation des divers processus cellulaires discutés. C'est par l'action conjointe d'une grande variété de facteurs cibles que la voie de signalisation BMP peut exercer son influence sur ces divers processus. Éventuellement, des liens devront être établis par rapport à la modulation de

l'expression des facteurs cibles de la voie BMP et le fait que cette modulation peut engendrer des effets sur plusieurs processus cellulaires à la fois. De plus, la génération d'un modèle murin présentant une délétion conditionnelle du récepteur BMPR1a, spécifique au compartiment mésenchymateux intestinal, via l'utilisation du système Cre/LoxP et en utilisant le promoteur COL1 α 2 afin de diriger l'expression de la recombinaise Cre, nous permettrait de réaliser des études sur les rôles de la voie BMP au niveau de ce tissu. De plus la délétion de *BMPR1a* au niveau du mésenchyme intestinal nous permettrait de déterminer l'importance de la voie BMP à l'intérieur des interactions épithélio-mésenchymateuses. Des études similaires pourrait aussi être réalisées via l'utilisation de shRNA afin d'abolir la signalisation par la voie BMP à l'intérieur d'une lignée fibroblastique en co-culture avec des cellules épithéliales intestinales. Tout au long de mes travaux à la maîtrise, nous avons porté notre intérêt sur étude l'étude de la voie BMP au niveau de l'épithélium intestinal. Toutefois, il serait intéressant de déterminer les différents rôles de cette voie de signalisation au niveau de l'épithélium gastrique en générant une délétion conditionnelle du récepteur BMPR1a à cet endroit via l'utilisation du système Cre/LoxP et du promoteur du cytochrome P450 de type 1A1 (CYP1A1) afin de diriger l'expression de la recombinaise Cre.

V – Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Nathalie Perreault, pour m'avoir confié ce projet de recherche qui aura été passionnant tout au long des deux dernières années. Je la remercie aussi pour sa confiance, son encouragement et ses judicieux conseils scientifiques.

Merci à Marianne, ma copine, qui a su me supporter et m'encourager tout au long de ma maîtrise en plus de m'avoir fait part de bons conseils et d'opinions au cours de la rédaction de mon mémoire. Merci à tous les membres du laboratoire du Dr Perreault : Benoit Auclair, assistant de recherche, à qui je dois le succès de certaines de mes expériences, Julie Drouin et Jean-François (Godzilla) Schmouth, qui m'ont côtoyés au cours de mon séjour au laboratoire. Merci aussi à Sonia Benoit, notre technicienne en santé animale, pour le travail accompli avec les souris à l'animalerie. J'aimerais également remercier Véronique Giroux et Sébastien Poulin qui ont fait des stages au laboratoire et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mes travaux.

Je tiens aussi à remercier le Dr François Boudreau, pour ses conseils et l'accès au matériel de son laboratoire. Merci à Denis Martel et Charles Bertrand au service de microscopie électronique ainsi qu'à François Desharnais au

laboratoire de pathologie de l'Université de Sherbrooke. Merci aux Drs Katz, Mishina, Gummucio et Gordon pour nous avoir fourni des outils essentiels à la réalisation de nos travaux.

Finalement, je tiens à remercier Dre Nathalie Rivard et Dre Claudine Rancourt pour avoir accepté de réviser ce mémoire.

VI – Bibliographie

Adams JC, Watt FM, Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 1993 Avr;117(4):1183-98.

Anant S, Murmu N, Houchen CW, Mukhopadhyay D, Riehl TE, Young SG, Morrison AR, Stenson WF, Davidson NO, Apobec-1 protects intestine from radiation injury through posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression. *Gastroenterology*. 2004 Oct;127(4):1139-49.

Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M, Miyazono K, Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci*. 2001 Avr;114(Pt 8):1483-9.

Baek SH, Kiousi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rose DW, Rosenfeld MG, Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18;100(6):3245-50.

Balemans W, Van Hul W, Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol*. 2002 Oct 15;250(2):231-50.

Beaulieu JF, Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci*. 1992 Juil;102 (Pt 3):427-36.

Beaulieu JF, Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem*. 1997;31(4):1-78.

Beaulieu JF, Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci*. 1999 Mar 15;4:D310-21.

Bitgood MJ, McMahon AP, Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*. 1995 Nov;172(1):126-38.

Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B, Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics*. 2002 Dec 3;11(3):115-32.

Boudreau F, Rings EH, Swain GP, Sinclair AM, Suh ER, Silberg DG, Scheuermann RH, Traber PG, A novel colonic repressor element regulates intestinal gene expression by interacting with Cux/CDP. *Mol Cell Biol*. 2002 Août;22(15):5467-78.

- Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, Traber PG, Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31909-17.
- Brittan M, Wright NA, Gastrointestinal stem cells. *J Pathol*. 2002 Jul;197(4):492-509.
- Calvert R, Pothier P, Migration of fetal intestinal intervillous cells in neonatal mice. *Anat Rec*. 1990 Jun;227(2):199-206.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR, Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41.
- Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, Massagué J, Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev*. 1998 Jul 15;12(14):2144-52.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM, The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999 May 6;18(18):2883-91.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, Ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM, Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J*. 1998 Jun 1;17(11):3091-100.
- Derynck R, Zhang Y, Intracellular signalling: the mad way to do it. *Curr Biol*. 1996 Oct 1;6(10):1226-9.
- Goldstein AM, Brewer KC, Doyle AM, Nagy N, Roberts DJ, BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev*. 2005 Jun;122(6):821-33.
- Grotewold L, Plum M, Dildrop R, Peters T, Ruther U, Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 2001 Fév;100(2):327-30.
- Gumbiner BM, Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996 Fév 9;84(3):345-57.
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H, De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1684-6.
- Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A, Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*. 1998 Jan 15;12(2):186-97.

- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L, BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet.* 2004 Oct;36(10):1117-21.
- Hermiston ML, Gordon JI, In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1995 Apr;129(2):489-506.
- Hermiston ML, Wong MH, Gordon JI, Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev.* 1996 Apr 15;10(8):985-96.
- Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, Velculescu VE, Traverso G, Vogelstein B, Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet.* 2001 Jun;28(2):184-7.
- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K, Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem.* 2000 Mar 3;275(9):6075-9.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH, The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development.* 2002 Jun;129(11):2619-28.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Chao HH, Ferraris RP, Kaestner KH. Foxl1 null mice have abnormal intestinal epithelia, postnatal growth retardation, and defective intestinal glucose uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Oct;287(4):G856-64.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K, Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998 Mar;9(1):49-61.
- Kehn K, Deng L, de la Fuente C, Strouss K, Wu K, Maddukuri A, Baylor S, Rufner R, Pumfery A, Bottazzi ME, Kashanchi F, The role of cyclin D2 and p21/waf1 in human T-cell leukemia virus type 1 infected cells. *Retrovirology.* 2004 Apr 13;1(1):6.
- Kendrick JS, Chan L, Higgins JA, Superior role of apolipoprotein B48 over apolipoprotein B100 in chylomicron assembly and fat absorption: an investigation of apobec-1 knock-out and wild-type mice. *Biochem J.* 2001 Jun 15;356(Pt 3):821-7.
- King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM, Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem.* 2003 Mar 28;278(13):11661-9.

Kojima T, Oshima K, Watanabe H, Komatsu M, The bovine Mx1 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, and promoter region. *Biochem Genet.* 2003 Dec;41(11-12):375-90.

Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A, Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell.* 2001 Apr;12(4):1079-91.

Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH, Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest.* 2004 Apr;114(4):512-20.

Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N, Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8226-34.

Laprise P, Viel A, Rivard N, Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):10157-66.

Leblond CP, Inoue S, Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat.* 1989 Apr;185(4):367-90.

Lee CS, Perreault N, Brestelli JE, Kaestner KH, Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev.* 2002 Jun 15;16(12):1488-97.

Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA, Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):11-24.

Leibach FH, Ganapathy V, Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:99-119.

Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H, Wu H, Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol.* 2000 Apr 6;10(7):401-4.

Liu Y, Helms AW, Johnson JE, Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development. *Development.* 2004 Mar;131(5):1017-28.

Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL, Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development.* 2005 Jan;132(2):279-89.

- Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, Gumucio DL, Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem*. 2002 Sep 6;277(36):33275-83.
- Majzoub JA, Muglia LJ, Knockout mice. *N Engl J Med*. 1996 Avr 4;334(14):904-7.
- Marieb EN, Anatomie et physiologie humaines. 2^e édition, ERPI. 1998, 1194 pp.
- Massey-Harroche D, Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc Res Tech*. 2000 Mai 15;49(4):353-62.
- Ménard D, Development of human intestinal and gastric enzymes. *Acta Paediatr Suppl*. 1994 Dec;405:1-6.
- Mishina Y, Hanks MC, Miura S, Tallquist MD, Behringer RR, Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis*. 2002 Feb;32(2):69-72.
- Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR, Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*. 1995 Dec 15;9(24):3027-37.
- Perreault N, Beaulieu JF, Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 1998 Nov 25;245(1):34-42.
- Perreault N, Katz JP, Sackett SD, Kaestner KH, Foxl1 controls the Wnt/beta-catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16;276(46):43328-33.
- Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS, Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(23):9041-54.
- Pozzi A, Zent R, Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp Nephrol*. 2003;94(3):e77-84.
- Randall RA, Germain S, Inman GJ, Bates PA, Hill CS, Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *EMBO J*. 2002 Jan 15;21(1-2):145-56.
- Reya T, Clevers H, Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005 Apr 4;434(7035):843-50.
- Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A, Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7947-56.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H, Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Dec;15(6):763-70.

- Sauer B, Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*. 1998 Apr;14(4):381-92.
- Scherrer B, Biostatistique. Éditions Gaetan Morin 1984, 850pp.
- Schmidt EV, The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene*. 2004 Avr 19;23(18):3217-21.
- Schneider A, Zhang Y, Guan Y, Davis LS, Breyer MD, Differential, inducible gene targeting in renal epithelia, vascular endothelium, and viscera of Mx1Cre mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Feb;284(2):F411-7.
- Shi Y, Massagué J, Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Juin 13;113(6):685-700.
- Shuldiner AR, Transgenic animals. *N Engl J Med*. 1996 Mar 7;334(10):653-5.
- Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, Moren A, Heldin CH, Christian JL, Ten Dijke P, Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. 1998 Sep 25;273(39):25364-70.
- Stein B, Rahmsdorf HJ, Steffen A, Litfin M, Herrlich P, UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol Cell Biol*. 1989 Nov;9(11):5169-81.
- Sund NJ, Vatamaniuk MZ, Casey M, Ang SL, Magnuson MA, Stoffers DA, Matschinsky FM, Kaestner KH, Tissue-specific deletion of *Foxa2* in pancreatic beta cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes Dev*. 2001 Jul 1;15(13):1706-15.
- Tian Q, He XC, Hood L, Li L, Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 kinase/Akt and 14-3-3zeta. *Cell Cycle*. 2005 Fév;4(2):215-6.
- Traber PG, Transcriptional regulation in intestinal development. Implications for colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol*. 1999;470:1-14.
- Tsang M, Kim R, de Caestecker MP, Kudoh T, Roberts AB, Dawid IB, Zebrafish *nma* is involved in TGFbeta family signaling. *Genesis*. 2000 Oct;28(2):47-57.
- Tymms MJ, Kola I, Gene Knockout Protocols. Humana Press. 2001, 350 pp.
- Van der Weyden L, Adams DJ, Bradley A, Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics*. 2002 Dec 3;11(3):133-64.
- Van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo MM, Clevers H, Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol*. 2005 Avr;7(4):381-6.

Vidrich A, Buzan JM, Cohn SM, Intestinal stem cells and mucosal gut development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2003 Nov;19(6):583-90.

Von Bubnoff A, Cho KW, Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*. 2001 Nov 1;239(1):1-14.

Wang EA, Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.

Whiting J, Marshall H, Cook M, Krumlauf R, Rigby PW, Stott D, Allemann RK, Multiple spatially specific enhancers are required to reconstruct the pattern of Hox-2.6 gene expression. *Genes Dev*. 1991 Nov;5(11):2048-59.

Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL, Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. 1995 Sep 1;9(17):2105-16.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA, Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.

Xu J, Attisano L, Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 25;97(9):4820-5.

Yamashita H, Ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K, Bone morphogenetic protein receptors. *Bone*. 1996 Dec;19(6):569-74.

Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda M, Noda T, Yamamoto T, Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*. 2000 Dec 22;103(7):1085-97.

Zhang H, Bradley A, Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 1996 Oct;122(10):2977-86.

Zhao GQ, Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis*. 2003 Jan;35(1):43-56.

Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, Kurose K, Aldred M, Hampel H, Launonen V, Virta S, Pilarski R, Salovaara R, Bodmer WF, Conrad BA, Dunlop M, Hodgson SV, Iwama T, Jarvinen H, Kellokumpu I, Kim JC, Leggett B, Markie D, Mecklin JP, Neale K, Phillips R, Piris J, Rozen P, Houlston RS, Aaltonen LA, Tomlinson IP, Eng C, Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet*. 2001 Oct;69(4):704-11.

Zucker S, Vacirca J, Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer.
Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Juin;23(1-2):101-17.